

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 mai 2003 (30.05.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/043415 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A01K 67/027, C12N 15/90, 15/63, 15/06, C12P 21/00

302, City Doyama B, Aikoh 480-3, Atsugi-shi, 243-0035
Kanagawa (JP).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/03992

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(22) Date de dépôt international :
21 novembre 2002 (21.11.2002)

(81) États désignés (*national*) : AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/15111 22 novembre 2001 (22.11.2001) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement*

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : **VI-
VALIS** [FR/FR]; Lieudit la Corbière, F-49450 Roussay
(FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA)** [FR/FR]; 145, rue de l'Uni-
versité, F-75007 Paris (FR). **CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)** [FR/FR];
3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). **ENS - ECOLE
NORMALE SUPERIEURE DE LYON** [FR/FR]; 46, al-
lée d'Italie, F-69000 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **PAIN,
Bertrand** [FR/FR]; 4 bis, place Bir-Hakeim, F-69003
Lyon (FR). **SAMARUT, Jacques** [FR/FR]; 169 bis, route
de Genas, F-69100 Villeurbanne (FR). **VALARCHE,
Isabelle** [FR/FR]; 4-6, rue Jules Vallès, F-44100 Nantes
(FR). **CHAMPION-ARNAUD, Patrick** [FR/FR]; 13,
avenue du Rayon vert, F-44300 Nantes (FR). **SOBCZYK,
André** [FR/FR]; 53-55, Bd de la Fraternité, F-44100
Nantes (FR). **KUNITA, Ryota** [JP/JP]; Room Number

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues*

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: EXOGENOUS PROTEIN EXPRESSION SYSTEM IN AN AVIAN SYSTEM

WO 03/043415 A1

(54) Titre : SYSTEME D'EXPRESSION DE PROTEINES EXOGENES DANS UN SYSTEME AVIAIRE

(57) Abstract: The invention concerns the use of an avian cell for producing an exogenous protein of interest in an animal belonging to the avian species, said cell being transformed by an expression vector comprising the gene coding for said protein, said cell being introduced in the sub-germinal cavity of an embryo, the blood stream of the embryo or being used as nucleus source for nuclear transfer into an avian egg enucleated or not, or whereof the chromosomes have been destroyed.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à l'utilisation d'une cellule aviaire pour la production d'une protéine exogène d'intérêt dans un animal appartenant à l'espèce aviaire, ladite cellule étant transformée par un vecteur d'expression comprenant le gène codant pour ladite protéine, ladite cellule étant introduite soit dans la cavité sub-germinale d'un embryon, la circulation sanguine de l'embryon ou servant de source de noyau pour le transfert nucléaire dans un ovocyte énuclée ou non, ou dont les chromosomes ont été détruits.

Système d'expression de protéines exogènes dans un système aviaire

5

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'une cellule aviaire pour la production d'une protéine exogène d'intérêt dans un animal appartenant à l'espèce aviaire, ladite cellule étant transformée par un vecteur d'expression comprenant le gène codant pour
10 ladite protéine, ladite cellule étant introduite soit dans la cavité sub-germinale d'un embryon, la circulation sanguine de l'embryon ou servant de source de noyau pour le transfert nucléaire dans un ovocyte énucléé ou non, ou dont les chromosomes ont été détruits.

15 Traditionnellement, les premiers principes pharmaceutiques étaient obtenus par extraction à partir de tissus de différentes origines tant végétales, animales que même humaines. Trois principaux facteurs ont contribué à la mise en place de substituts à cette technique d'extraction. La raréfaction des tissus en raison de l'augmentation de la demande, les risques inhérents aux dérivés animaux et humains ont augmenté, avec
20 l'apparition ou l'identification de nouvelles pathologies, notamment virales et non conventionnelles. Enfin et surtout, la recherche et l'utilisation des découvertes des différentes branches de la biologie (biochimie, biologie moléculaire ...) ont permis de découvrir et donc de satisfaire la demande sans cesse croissante de nouvelles molécules.

25 Pour répondre à la demande en produit thérapeutique, les systèmes d'expression de molécules, comme les protéines à usage thérapeutique, ont été associés à une composante biologique active (bactérie, levure, cellule eucaryote supérieure...) et un élément génétique qui apporte le support nécessaire à la production. Les différents supports génétiques utilisés sont le plus souvent soient des vecteurs d'expression
30 simples optimisés pour l'expression mais dont l'intégration demeure aléatoire soient des systèmes viraux ou rétroviraux. Ces derniers ne permettent pas non plus de contrôler ni le lieu et ni le niveau d'expression.

Ces méthodes de production sont actuellement en train de vivre une nouvelle révolution tant numérique que qualitative. Ainsi, en l'espace de quelques années, grâce aux progrès constants, rapides de la génomique et de la biologie moléculaire, le nombre de molécules qui possède une ou plusieurs potentialités thérapeutiques et médicales a significativement augmenté. Par exemple, les anticorps à visée thérapeutique représentent déjà environ 50% de ces molécules. De plus, la complexité de ces molécules recombinantes s'est accentuée. Des simples peptides ou petites cytokines, produits facilement dans les bactéries, on arrive progressivement à des molécules complexes, avec une activité biologique strictement dépendante de leur structure secondaire, de leur repliement et de modifications post traductionnelles complexes. En conséquence, le simple moyen de production dans les bactéries ne suffit plus.

Des techniques plus sophistiquées ont alors émergé, parmi lesquelles on peut citer la culture in vitro de cellules eucaryotes, les levures et les cellules d'insecte. Plus récemment encore, les progrès réalisés en transgénèse végétale et animale ont été mis à profit pour produire ces molécules complexes soit dans des feuilles ou des graines d'espèces végétales (tabac, maïs...) soit dans les liquides physiologiques des animaux comme le lait d'animaux (chèvre, vache, truie, lapin...).

En outre, la corrélation entre l'efficacité de criblage d'un locus donné et son niveau de transcription, notamment au niveau des cellules ciblées par le vecteur dont les cellules souches n'est pas absolue. Ainsi, ces méthodes présentent toujours des problèmes tels que le coût de production, la quantité de produits obtenus et des difficultés techniques lorsqu'ils s'agit de produire des molécules complexes.

Pour résoudre ces problèmes, il est proposé dans le cadre de l'invention de produire des molécules thérapeutiques en ciblant l'expression dans des tissus spécifiques, notamment dans l'œuf et en particulier dans le blanc de l'œuf à l'aide d'animaux modifiés avec des cellules souches, elles même modifiées par des vecteurs de recombinaison.

Les différentes étapes nécessaires à la mise en œuvre de l'invention impliquent d'abord la construction de vecteurs, qui permet le ciblage du locus choisi dans une cellule aviaire et en particulier une cellule souche, l'obtention de cellules recombinées qui intègre ce vecteur dans le locus choisi et la génération des animaux modifiés avec ces
5 cellules.

Un des avantages de l'ensemble de ce système est le caractère contrôlé de l'expression de la protéine d'intérêt. En effet, l'action de remplacement substitution d'un locus endogène aviaire par un gène ou un fragment de gène exogène d'intérêt permet
10 d'obtenir une production de la protéine exogène introduite en lieu et place du locus endogène. Par exemple, en introduisant dans le locus de l'ovalbumine le gène à produire par l'ensemble du mécanisme décrit, le produit de ce gène sera produit selon le profil d'expression de l'ovalbumine, parfaitement connu. Ainsi, l'invention apporte une solution aux problèmes soulevés par l'intégration au hasard d'une séquence hétérologue
15 dont l'expression pourrait dépendre de son environnement chromatinien.

En outre et contrairement aux méthodes évoquées ci-dessus, le système de production aviaire de l'invention permet d'obtenir des quantités supérieures de substances actives à moindre coût étant donné qu'elles peuvent être facilement isolées et purifiées.

20

Un processus de recombinaison dans une lignée de cellules lymphoïdes (la lignée DT40) a été rendu possible grâce à un processus de recombinaison en raison d'une mutation particulière (la mutation affecte le niveau d'expression de la protéine Rad54) (Kim et al., 1990 ; Baba et al., 1988; Buerstedde et al., 1990 ; Buerstedde and Takeda,
25 1991 ; Bezzubova et al., 1993; Bezzubova et al., 1997). Dans cette publication, les auteurs reconnaissent ne pas avoir été en mesure d'effectuer de la recombinaison homologue avec des cellules ES.

Contrairement à cet enseignement, le demandeur a démontré qu'un processus de
30 recombinaison homologue ciblé permet une expression d'une molécule exogène d'intérêt dans des systèmes aviaires et que ce même processus est maîtrisable au niveau

expérimental dans différents types de cellules aviaires, dont des lignées, des cellules primaires et des cellules souches et cellules souches embryonnaires.

L'objet de l'invention est donc :

- 5 - des vecteurs de recombinaison homologue permettant de cibler et de substituer, totalement ou partiellement les protéines de l'œuf et en particulier celles du blanc par des molécules d'intérêt,
- l'obtention de cellules souches aviaires spécifiquement modifiées aux loci ciblés par lesdits vecteurs,
- 10 - l'utilisation de cellules aviaires spécifiquement modifiées par ces vecteurs pour une expression in vitro des molécules d'intérêt,
- l'obtention et la production de forte quantité de molécules d'intérêt par les animaux obtenus avec ces cellules aviaires spécifiquement modifiées par lesdits vecteurs de recombinaison.
- 15 - La production des molécules d'intérêt dans des organes ou tissus desdits animaux de l'espèce aviaire permettant une extraction, une isolation et une purification simple et économiquement avantageuse.

L'ensemble de cette invention permet donc de proposer un système original de
20 production de molécules d'intérêt selon un mode parfaitement prédictible car contrôlé tant au niveau spatial que temporel, apportant les réponses aux problèmes existant dans l'état de la technique.

DESCRIPTION

25 Ainsi, dans un premier aspect, l'invention se rapporte à l'utilisation d'une cellule aviaire pour la production d'une protéine exogène d'intérêt dans un animal appartenant à l'espèce aviaire, caractérisée en ce que ladite cellule est transformée par un vecteur d'expression comprenant le gène codant pour ladite protéine, ladite cellule étant
30 introduite soit dans la cavité sub-germinale d'un embryon, la circulation sanguine de

l'embryon ou servant de source de noyau pour le transfert nucléaire dans un ovocyte énucléé ou non, ou dont les chromosomes ont été détruits.

- 5 Par cellule aviaire, on entend une cellule précurseur, une cellule somatique, une cellule souche, une cellule souche embryonnaire (ES), une cellule pluripotente, une cellule totipotente, une cellule germinale, une cellule germinale souche (EG), une cellule germinale primordiale (PGC), un clone cellulaire des cellules précitées, une lignée établie à partir des cellules précitées ou un corps embryoïde obtenu à partir des cellules précitées.
- 10 Les différentes cellules visées précédemment sont davantage définies ci-après :
- Par cellule précurseur, on entend toute cellule d'un tissu adulte ou embryonnaire partiellement différenciée et qui est capable de se diviser et de donner des cellules différenciées.
 - 15 - Par cellule somatique, on entend toute cellule d'un embryon ou d'un adulte, autre qu'une cellule germinale.
 - Par cellule souche embryonnaire (ES), on entend une cellule non différenciée dérivant d'un embryon et qui a les potentialités de donner une très large variété de cellules spécialisées.
 - 20 - Par cellule souche, on entend toute cellule présentant la capacité à se diviser in vitro en culture pendant des périodes de temps infinis et capables de donner différents types cellulaires spécialisés.
 - par cellule pluripotente, on entend une unique cellule qui a la capacité à se différencier en cellules dans les trois feuillets embryonnaires.
 - 25 - Par cellule totipotente, on entend une cellule présentant une capacité illimitée de prolifération, état limité à la cellule oeuf.
 - par cellule germinale, on entend les spermatozoïdes et l'ovocyte, ou leurs précurseurs capables de donner un spermatozoïde et un ovocyte. Toutes les autres cellules sont des cellules somatiques.

- Par cellules germinales souches (EG) , on entend les cellules trouvées dans une partie spécifique de l'embryon appelées les crêtes génitales, devenant les gonades dans l'organisme adulte. Ces cellules se développent normalement en gamètes matures.
- Par clone cellulaire, on entend tout ensemble de cellules génétiquement identiques à la cellule de laquelle elles dérivent par division.
- Par corps embryoïdes, on entend tout agrégat de cellules dérivant des cellules souches embryonnaires maintenues en culture. Les corps embryoïde ne participent pas au développement normal d'un embryon et s'observent seulement in vitro.
- Par lignée, on entend toute culture cellulaire capable de proliférer indéfiniment en gardant les mêmes caractéristiques phénotypiques.

I- Différents vecteurs peuvent être mis en oeuvre pour la transformation desdites cellules :

- Le vecteur utilisé à cet effet, qu'il soit un vecteur de recombinaison soit un vecteur d'expression simple, permet une expression tissu-spécifique, en particulier dans l'oviducte, le foie, le sang, la moelle et les organes lymphoïdes.

1.1 Vecteurs de recombinaison.

- Le vecteur de recombinaison homologue permet de cibler un locus endogène pour exprimer un gène d'intérêt en lieu et place de ce locus endogène. Au niveau de la chromatine, la recombinaison homologue est un processus qui consiste à remplacer partiellement ou totalement une partie d'un gène par une construction qui reprend en partie ou en totalité certaines séquences à l'identique de ce même gène. Les parties identiques permettent de réaliser l'échange de l'ADN apporté dans le locus endogène et d'introduire les parties modifiées dans l'environnement considéré et donc respecté du locus ciblé. Il en résulte une insertion dans le locus ciblé de modifications apportées par certaines parties de la construction. Les parties différentes de la construction permettent de contrôler l'expression des cassettes introduites. Ces cassettes sont soit dépendantes

de leur propre promoteur, soient dépendantes de l'activité transcriptionnelle du locus ciblé, quand la cassette est placée sous la dépendance du promoteur interne.

La réaction de recombinaison peut être divisée en trois grandes étapes :

- 5 - La première étape est l'appariement des régions homologues, conduisant à une structure transitoire 'trois brins' du DNA.
- La seconde étape est la réalisation d'un double crossing over indépendants dans les régions d'homologies, conduisant à la formation d'une molécule hybride entre le chromosome ciblé et le vecteur introduit
- 10 - La troisième est l'intégration de ce vecteur comme élément génétique stable du chromosome ciblé, la modification étant alors propagée comme l'ensemble du matériel génétique avec les divisions cellulaires

15 Tout élément, présent dans le système ou apporté de façon stable ou transitoire qui contrôle, modifie ou influence ces différents mécanismes aura une contribution essentielle dans le processus de recombinaison et donc dans l'efficacité d'intégration du vecteur.

20 Dans le cadre de l'invention, le vecteur de recombinaison qui permet de produire les molécules dans le système aviaire, notamment chez le poulet n'est pas un simple vecteur de destruction, mais un vecteur de remplacement substitutif. Ces vecteurs complexes sont le résultat de l'association ordonnée et successive dans un plasmide de clonage classique (pBSK, pUC,...) d'au moins un des éléments suivants :

- 25 - Un fragment d'ADN génomique, de taille variable, pris en amont de l'ATG (site de démarrage de la traduction) du gène ciblé. Cet élément constitue le bras 5'.
- Un cDNA ou une partie du ou des gènes d'intérêt, placé directement sous la dépendance de l'ATG du gène ciblé endogène. Cette association des fragments est dans la plupart des cas directement réalisée par une fusion sur l'ATG du locus ciblé avec le
- 30 deuxième acide aminé de la protéine. De plus, pour permettre l'exportation directement dans l'œuf de la protéine d'intérêt, une séquence nucléotidique spécifiant un peptide

signal doit être placée en amont du cDNA d'intérêt et en aval des signaux du gène ciblé. Elle est soit apportée soit par le fragment d'intérêt, soit par une séquence nucléotidique exogène supplémentaire.

- 5 Par cDNA, on entend toute ou partie d'une séquence codante d'acide nucléique pour une protéine d'intérêt.

Par protéine d'intérêt, on entend une protéine, un fragment d'une protéine ou un peptide qui présente un intérêt thérapeutique pour l'homme ou l'animal, mais aussi toute forme protéique susceptible d'apporter à l'homme ou à l'animal un bienfait quant
10 à son statut physique, sa santé, son comportement ou sa vitalité, ce qui comprend notamment une protéine ou un peptide d'intérêt endogène et une protéine ou un peptide d'intérêt exogène définie ci-dessous :

Par protéine d'intérêt endogène, on entend toute protéine présente dans le système, l'œuf en particulier, présente à des niveaux variables mais détectables dans une situation
15 physiologique normale.

Par protéine d'intérêt exogène, on entend toute protéine d'origine exogène au système, non identifiée dans le système, l'œuf en particulier, dans un état physiologique normal. Sa présence est le résultat direct ou indirect de la modification génétique et /ou biochimique induite par le vecteur dans le système.

20

- Une cassette de résistance (dite cassette de sélection positive à un système exogène de sélection) constituée généralement d'un promoteur, d'un cDNA qui apporte la résistance à la sélection exogène et d'une séquence poly A permettant l'arrêt de la transcription de cet élément transcriptionnel indépendant. Le promoteur peut être de
25 différentes origines.

- Un fragment d'ADN génomique, de taille variable, pris en aval de ces différents éléments et donc de l'ATG du gène ciblé. Ce fragment présente en général une taille différente du fragment d'ADN génomique situé en 5'. Cet élément constitue le bras 3'.

30

- Une cassette supplémentaire dite de sélection négative peut être incorporée dans ce vecteur. Elle est alors en général intégrée en aval du bras génomique 3'. Située en 3' du bras d'homologie 3', cette cassette ne persiste pas dans le génome de la cellule ciblée si l'intégration a lieu selon le schéma correct. Seuls les événements non recombinaison
5 correctement sont sensibles à cette action.

- Au moins un site de linéarisation unique sur le vecteur, recommandé par l'expérience. Cette étape semble nécessaire pour l'introduction efficace de ce vecteur dans le patrimoine génétique de la cellule ciblée.

10

- Différents éléments permettant notamment des modifications conditionnelles peuvent être insérés à différents endroits de la construction

Les principales caractéristiques d'un vecteur de recombinaison tel qu'ils sont décrits à ce jour dans les systèmes mammifères tiennent dans la succession des différents
15 éléments au sein du plasmide et dans le positionnement des bras génomiques (origine du DNA, taille des éléments génomiques homologues, dissymétrie relative...). Dans la majorité des cas, la fréquence de recombinaison observée in vitro est dépendante du locus ciblé donc de l'environnement chromatinien ciblé (Ramirez-Solis et al., 1993 ;
20 Hasty et al., 1995 ; Hasty et al., 1991). Cet environnement est étroitement lié à la physiologie de la cellule. Il apparaît que la pression de sélection appliquée sur les cellules transfectées permet un nombre d'intégrations majoritairement non homologues par rapport au nombre d'intégrations homologues. Le processus de criblage, dont le principe et les exemples sont développés dans le texte permet de distinguer les deux
25 types d'évènements. Connaître, évaluer et maîtriser la proportion d'intégration homologue est essentielle pour une stratégie d'expression satisfaisante. La fidélité de la recombinaison entre les fragments apportés et ceux d'origine doit également être la meilleure possible. Cela semble être le cas au moins pour les cellules ES de souris et les fibroblastes humains (Zheng et al., 1991; Lederman et al., 2000 ; Templeton, 2000).

30

Par ailleurs, la seule composition en base d'un locus peut fortement influencer les efficacités de recombinaison, notamment par la forte présence de nombreux îlots CpG (Yanez and Porter, 2000). D'autres éléments cryptiques (séquence poison) peuvent également modifier l'efficacité du processus de recombinaison homologue (sites
5 d'initiation de réplication, séquences répétées...). De plus, la fréquence de recombinaison homologue semble très dépendante de la cellule cible, avec des situations particulières comme pour la lignée de cellules lymphoïdes DT40 de poulet, qui présente des taux de recombinaison impressionnants (> 10%). Cette spécificité est liée à une sur-expression de la molécule Rad54, sans doute liée à une mutation, non
10 encore identifiée qui intervient dans le contrôle du niveau de régulation de ce gène (Bezzubova et al., 1993 ; Bezzubova et al., 1994 ; Bezzubova et al., 1997). Cette observation peut donner lieu à une augmentation de la fréquence de recombinaison .

Dans le cadre de l'invention, on a démontré l'efficacité de la recombinaison homologue
15 dans des cellules embryonnaires aviaires et certaines autres cellules aviaires primaires qui ont été établies en lignée.

Dans un mode complémentaire de réalisation, on peut faire surexprimer Rad54 ou une protéine de la famille rad dans le but d'améliorer l'efficacité du processus de recombinaison.

20

Longueur des fragments homologues

Quelques études réalisées dans des cellules souches embryonnaires de souris sur différents loci indiquent qu'une longueur minimum des bras 5' et 3' d'homologie est nécessaire pour assurer une recombinaison au locus avec une fréquence satisfaisante
25 (Hasty et al., 1991; Thompson et al., 1989 ; Thomas and Capecchi, 1987). Si une taille minimale de 250-500 bp semble être suffisante pour assurer un événement de recombinaison d'un des deux cotés, le paramètre clef serait plus la longueur totale d'homologie que la taille respective des bras d'homologie (Elliott et al., 2001 ; Philips and Calos, 1999 ; Fujitani et al., 1995). Cette limite serait de 5 à 6 kb au minimum.
30 L'extrapolation des résultats à partir des données très complètes obtenues chez les bactéries, pourrait indiquer que le facteur limitant dans une efficacité de recombinaison

ne serait pas au niveau de la recherche des homologies entre les fragments d'ADN donneurs apportés par le vecteur et les parties d'ADN receveurs du locus à cibler (Yancey-Wrona and Caerini-Otero, 1995), mais plutôt dans le système d'échange entre ces fragments qui succède à l'appariement. Néanmoins, une grande prudence reste de
5 mise quant à l'interprétation de ces résultats et leur extrapolation dans le système eucaryote, éventuellement sensibles à la présence de points facilitants ('hot spot') la recombinaison dans des loci particuliers.

Les loci d'immunoglobulines semblent à cet égard très particuliers. Des événements d'intégration homologue d'un vecteur ne présentant une homologie que dans le bras en
10 3' ont été observés (Berinstein et al., 1992). Par ailleurs les recombinaisons dans les loci d'immunoglobulines apparaissent particulier en raison de l'activité des sites reconnus par les recombinaisons propres à ces gènes. Certaines interférences avec l'équipement de ces cellules et le processus de recombinaison pourraient être observées.

15 Ainsi, dans un aspect particulier, le vecteur est un vecteur de recombinaison homologue possédant des bras 5' et 3' d'homologie aux séquences d'un locus donné. Le locus ciblé est sélectionné par exemple parmi le locus de l'ovalbumine, des ovomucoïdes, de la conalbumine et du lysozyme.

20 A ce titre le vecteur comporte des segments hétérologues :

Cette présence d'une partie importante homologue est d'autant plus nécessaire que les segments hétérologues sont importants (Kumar and Simons, 1993). Ainsi, l'approche isogénique (Te Riele et al., 1992) est renforcée par l'observation de baisse de fréquence de recombinaison homologue en cas d'interruption de long fragment d'homologies par
25 des 'stretches' variables, liés à la présence de polymorphisme d'un locus (Lukacsovich and Waldman, 1999). Mais la présence symétrique de segments hétérologues, situés en amont des éléments d'homologies propres peut également renforcer les niveaux d'intégration homologue du vecteur. Cette présence protégerait les homologies des dégradations induites par des exonucléases.

Induction d'une coupure ciblée

Toute induction ciblée (par une méganucléase par exemple) d'une coupure double brin, coupure spécifique et rare dans le DNA de la cellule ciblée accroît les fréquences de recombinaison. Il semblerait que cette induction déclenche le système de réparation et
5 facilite l'incorporation du DNA exogène (Bibikova et al., 2001 ; Sargent et al., 2000 ; Donoho et al., 1998 ; Sargent et al., 1997; Brenneman et al., 1996 ; Hasty et al., 1992b). Cette approche est utilisée notamment en introduisant un site spécifique reconnu par une méganucléase, notamment de type I-SceI ou autre, afin de favoriser les événements de recombinaison (Sarig et al., 2000 ; Cohen-Tanoudji et al., 1998; Robine et al., 1998 ;
10 Jasin et al., 1996) .

Linéarisation d'un vecteur

Des tests comparatifs entre vecteurs linéaire et circulaire ont été réalisés. Dans le système murin, il semble que la linéarisation soit un préalable nécessaire pour accroître
15 les fréquences. D'autres actions de délivrance ont parfois une influence (Yanez et Porter, 1999).

Structure conditionnelle des vecteurs d'expression

Les différents éléments présents actuellement dans les vecteurs sont actifs de façon constitutive une fois l'événement de recombinaison homologue réalisé. Or l'expression
20 d'une protéine exogène dans l'œuf peut entraîner une éventuelle toxicité à la fois au niveau du tissu qui va assurer la production et éventuellement au niveau de l'œuf, lieu d'accumulation final. Cette accumulation doit donc pouvoir être induite et décidée tant au niveau temporel que spatial.

25 Une des approches possible est l'utilisation de systèmes inductibles et conditionnels.

Par système inductible on entend par exemple le système appelé Tet off/tet on. Ce dernier est constitué de deux éléments : le donneur et l'opérateur. Le système donneur comprend lui même une construction génétique dérivée d'un système de résistance à la tétracycline, identifiée dans un transposon bactérien Tn10. En l'absence de tétracycline,
30 la protéine répresseur TetR, exprimé constitutivement bloque la transcription du gène assurant la résistance à la tétracycline. En présence de la tétracycline, le répresseur ne

peut plus se lier aux séquences de contrôle. Ce système a été mis à profit en fusionnant cette séquence tetR avec le domaine transactivateur de la protéine virale VP16 (Gossens and Bujard, 1992), brevet US N° 5, 589,362. Il en résulte les protéines tTA (pour Tetracycline controlled Trans Activator) pouvant agir sur le promoteur lui même
5 modifié TetO (pour Tet Opérateur). Dans le cas des vecteurs décrits dans l'invention, un premier vecteur 'donneur' (vecteur simple ou ciblant par recombinaison un locus spécifique du tissu oviducte par exemple) est introduit dans la cellule souche et les éléments sensibles à l'action de la tétracycline sont placés au sein de la construction de recombinaison qui cible le locus de l'ovalbumine par exemple. Ces éléments sont
10 insérés dans une région du promoteur ovalbumine pour contrôler au niveau transcriptionnel le niveau de protéine exprimé.

Parmi les autres systèmes inductibles on peut citer les fusions de ces différents acteurs (VP16, Gal4...) avec des séquences protéiques de contrôle comme certains récepteurs aux hormones nucléaires, plus ou moins modifiées pour répondre de façon spécifique à
15 la présence d'analogues d'hormones (ER Muté liant le tamoxifène (Metzger et al., 1995 ; Indra et al., 1999), l'ecdysone Récepteur, le PR liant le RU486...).

Par système conditionnel on entend par exemple les systèmes mettant en œuvre certaines enzymes comme certaines recombinaisons. Ces enzymes reconnaissent des
20 petites séquences particulières et spécifiques (séquences loxP pour l'enzyme CRE, séquence FLP pour la FRT recombinaison...) qui sont alors insérées dans la construction à contrôler. Le mode d'action général est de procéder à une délétion des éléments situés entre ces séquences lors de l'action de la recombinaison. L'introduction de la recombinaison est effectuée par différentes voies (transfection transitoire, expression stable intégrée...) et son expression conditionne la réaction d'excision au niveau des séquences
25 introduites.

En combinant la présence de ces recombinaisons avec les systèmes inductibles par les récepteurs des hormones nucléaires, on rend l'ensemble du système conditionnel inductible. Ainsi, on peut par exemple fusionner la CRE recombinaison avec la forme
30 mutée du ER, sensible au tamoxifène. Ce système a été mis à profit dans le système

murin (Metzger and Chambon, 2001; Vallier et al., 2001). D'autres systèmes ont été décrits pour le système murin comme le FLT-EcDR (Sawicki et al., 1998).

Eléments de base des constructions

- 5 L'origine des éléments de base des vecteurs est variable. Les squelettes des principaux plasmides sont d'origine commerciale. Ils permettent une propagation facile des constructions qu'ils portent dans un environnement bactérien bien maîtrisé, celui de *E. coli*, même si différentes souches sont utilisées. Ainsi, les plasmides pBSK, pMCS5, pCI Néo sont utilisés pour être une base générale à beaucoup de vecteurs intermédiaires
10 ou terminaux

Les cassettes de sélection positives sont constituées :

- d'un promoteur provenant de différentes origines, virales comme par exemple le promoteur CMV (cyomégalo virus), le promoteur du virus SV40, la LTR du RSV ou non virales comme des promoteurs de gènes ubiquitaires (comme le promoteur b-actine
15 de poulet) ou des promoteurs de gènes spécifiquement exprimés à certaines phases de développement ou des promoteurs de gènes spécifiquement exprimés dans certains tissus. Un cas particulier est d'utiliser un promoteur spécifique de l'état de cellule souches.
- d'un gène codant pour une résistance 'positive' à un antibiotique comme par
20 exemple le gène de résistance à la néomycine, à l'hygromycine, à la puromycine, à la phléomycine, à la zéomycine, à la blasticidine, à la viomycine mais aussi le gène DHFR (dihydrofolate reductase) assurant la résistance au methotrexate, le gène HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl transférase) assurant la transformation de bases spécifiques présentes dans le milieu de sélection HAT (aminoptérine, hypoxanthine,
25 thymidine) ainsi que d'autres gènes assurant les détoxifications vis à vis de certaines drogues.

Les cassettes de sélection négatives sont constituées :

- d'un promoteur comme précédemment décrit
- d'un gène assurant la transformation d'un substrat présent dans le milieu de culture en
30 une substance toxique pour la cellule qui exprime le gène. Parmi ces molécules, on peut citer les gènes de détoxification de la toxine diphtérique (DTA) (Yagi et al., 1998;

Yanagawa et al., 1999), le gène de la thymidine kinase du virus Herpes (HSV TK), sensible à la présence de gancyclovir ou de FIAU. Le gène HPRT peut également être utilisé comme sélection négative par addition dans le milieu de la 6-thioguanine (6TG).

- et pour l'ensemble des sélections positives et négatives, d'une séquence poly A de terminaison de transcription de différentes origines dont les plus classiques sont celles dérivées du poly A de SV40 ou d'un poly A de gène eucaryote (hormone de croissance bovine, b-globine de lapin...).

- Un cas particulier est la mise de la cassette de sélection positive sous la dépendance directe du locus endogène ciblé. Cette approche requiert la fonctionnalité, donc l'activation transcriptionnelle du locus ciblé pour pouvoir être utilisée et donc de lier la sélection des clones après transfection à un état de différenciation ou de non différenciation particulier. Ces exemples ne sont pas limitatifs.

Ainsi, le vecteur de recombinaison homologue selon l'invention comprend dans une base plasmidique un enchaînement de au moins un élément pris successivement parmi

- h) un fragment d'ADN génomique contenant le bras d'homologie 5' du gène ciblé fusionné à,
- h) une séquence nucléotidique signal de sécrétion fusionnée à,
- h) une courte séquence nucléotidique intronique fusionnée à,
- h) la séquence nucléotidique codante pour la protéine d'intérêt fusionnée à,
- h) une séquence poly A de terminaison de la transcription fusionnée à,
- h) une cassette de sélection positive comprenant un promoteur, un gène de résistance à un agent de sélection et une séquence poly A de terminaison de transcription, ladite cassette pouvant être fusionnée à,
- h) un fragment d'ADN génomique contenant le bras d'homologie 3' du gène ciblé,
- h) une cassette de sélection négative comprenant un promoteur, un gène assurant la transformation d'un substrat présent dans le milieu de culture en une substance toxique pour la cellule qui exprime le gène et une séquence polyA de terminaison de transcription.

- Par promoteur, on entend toute séquence nucléotidique capable d'assurer et de diriger l'initiation de la transcription d'un gène placé en aval de cette séquence.

5 Ce vecteur peut également comprendre d) la séquence codante pour la protéine exogène fusionnée en son extrémité 5' avec c) une courte séquence intronique en particulier comprenant la séquence SEQ ID N° 1 elle-même fusionnée avec e) une séquence peptide signal de sécrétion, en particulier la séquence codante pour le peptide signal du lysozyme comprenant la séquence SEQ ID N° 2.

10 Le vecteur selon l'invention peut également comprendre d) la séquence codante pour la protéine exogène fusionnée en son extrémité 3' avec une séquence poly A.

Le vecteur peut également comprendre au moins une séquence IRES en fusion avec au moins deux séquences codantes pour la protéine d'intérêt exogène ou au moins une séquence IRES en fusion avec au moins deux séquences codantes pour différentes
15 chaînes constituant une protéine d'intérêt, en particulier les chaînes lourde et légère d'un anticorps de quelque nature que ce soit, en particulier un anticorps monoclonal, un fragment fab.

Parmi les IRES, on choisit les IRES de groupe I ou de groupe II, en particulier les
20 séquences VI30 (Brevets US 5,925,565 ; FR 95/00894), Idemfix et Zam (WO 99/29844), (Leblanc et al. 1997 ; 1999).

1.2 Vecteur d'expression simple

Ces vecteurs sont caractérisés par l'association successive d'un promoteur, d'un cDNA
25 ou d'une partie d'un gène, d'une séquence poly A, permettant l'arrêt de la transcription. Après transfection de ces vecteurs dans des cellules eucaryotes, ces vecteurs présentent l'avantage et l'inconvénient de s'intégrer au hasard dans le génome. L'efficacité est souvent bonne et un grand nombre de sites d'intégration peuvent être obtenus. Cependant, le côté aléatoire de cette insertion rend l'expression à partir du promoteur
30 porté par le vecteur dépendante de l'environnement du site d'insertion (méthylation, imprinting, enhancer, silencer...).

Ainsi, parmi les promoteurs utilisables dans le cadre de l'invention répondant à ces difficultés et utilisés dans un but d'expression tissu spécifique, on peut mentionner de façon non exhaustive le promoteur du gène du lysozyme (de 2500 à 100 bp), mais aussi
5 le promoteur du gène de l'ovalbumine, dans des formes longues (de 5 à 1 kb) contenant des régions de régulations positives et négatives ou courtes (de 1000 à 100 bp), sachant qu'un promoteur minimal de 100 bp environ peut être spécifiquement activé par différentes hormones (Monroe and Sanders, 2000).

L'exemple 1 ci-après illustre les possibilités d'obtention de clones de cellules souches
10 avec de tels vecteurs simples d'expression.

Le vecteur utile dans le cadre de l'invention peut donc être un vecteur d'expression comprenant la séquence codante pour la protéine d'intérêt fusionnée avec au moins un élément pris parmi

- 15 a) un promoteur, en particulier sélectionné parmi les promoteurs des gènes de l'ovalbumine, des ovomucoïdes, de la conalbumine et du lysozyme,
- b) une séquence peptide signal
- c) une séquence nucléotidique polyA de terminaison de transcription.

20

Ce vecteur d'expression et le vecteur de recombinaison peuvent comprendre une séquence IRES fusionnée avec au moins deux séquences codantes pour la même protéine d'intérêt ou pour des séquences codantes différentes.

25 Les vecteurs précités permettent de transformer une cellule aviaire telle que définie précédemment.

Avantageusement, ladite cellule est une cellule aviaire embryonnaire primaire, une cellule aviaire embryonnaire souche, en particulier les cellules embryonnaires souches issues de la mise en culture de blastodermes.

- par blastoderme, on entend un embryon aviaire à un stade précédant la gastrulation et comportant une organisation cellulaire simple avec au moins deux couches de cellules séparées par une cavité.

- 5 La cellule embryonnaire aviaire de l'invention présente un phénotype alcaline phosphatase positive, en particulier un phénotype de cellule souche embryonnaire alcaline phosphatase positive.

Les cellules embryonnaires aviaires, les cellules souches embryonnaires et les cellules germinales embryonnaires se caractérisent en ce qu'elles réagissent spécifiquement avec
10 au moins un anticorps sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6.

La cellule selon l'invention peut également être une cellule aviaire primaire de phénotype défini en particulier pour un fibroblaste primaire, une cellule épithéliale, une
15 cellule endothéliale.

Dans un mode particulier de réalisation, la cellule est une cellule aviaire dérivée d'une cellule embryonnaire primaire et établie spontanément en culture ou à l'aide de différents agents immortalisants, en particulier les cellules dérivées des cellules souches
20 embryonnaires induites à différencier sous l'action de différents agents inducteurs en particulier l'acide rétinoïque, le diméthylsulfoxyde, le TPA ou de conditions de cultures spécifiques, en particulier par la formation de corps embryoïdes (voir définition ci-dessus).

25 Alternativement, la cellule est une cellule aviaire établie en lignée, en particulier les cellules hépatiques LMH, les cellules monocytes HD11 et les cellules fibroblastiques QT6.

Comme évoqué précédemment, ladite cellule peut être transformée avec un vecteur
30 d'expression exprimant une protéine de la famille Rad, en particulier la protéine Rad54.

Ainsi, dans un deuxième aspect, l'invention se rapporte à un procédé d'obtention d'une cellule aviaire modifiée par un des vecteurs définis ci-dessus.

Ce procédé peut comprendre les étapes suivantes

- 5 a) introduction du vecteur défini selon l'une des revendications ci-dessus dans une cellule embryonnaire aviaire par une méthode de transfection, en particulier à l'aide d'un liposome, d'un polycation ou par électroporation
- b) sélection des cellules par l'addition d'un agent de sélection dans le milieu de culture, en particulier la généticine dans une gamme de concentration de 100 à 500 µg/ml
- 10 c) criblage des clones résistants et amplification.

De préférence, cette sélection est réalisée pendant au moins environ 2 à 10 jours, notamment 2, 3, 4, 5 ou 6 jours.

Avantageusement, l'invention se rapporte à un procédé d'obtention d'une cellule aviaire modifiée par un des vecteurs définis ci-dessus comprenant les étapes suivantes :

- 15 a) introduction du vecteur défini selon l'une des revendications ci-dessus dans une cellule embryonnaire aviaire par une méthode de transfection, en particulier à l'aide d'un liposome, d'un polycation ou par électroporation
- b) sélection des cellules par l'addition d'un agent de sélection dans le milieu de culture, en particulier la généticine dans une gamme de concentration de 100 à 500 µg/ml
- 20 c) obtention de clones recombinés génétiquement stables présentant une morphologie et des caractéristiques similaires aux cellules parentales (taux d'alkaline phosphatase endogène, réactivité à des anticorps de surface, et activité télomérase)
- 25 d) criblage des clones résistants et amplification des cellules résistantes résultantes correctement recombinées.

Dans un aspect particulier, le vecteur de recombinaison cible le locus du lysozyme.

L'invention a également trait à un procédé mentionné précédemment caractérisé en ce que le surnageant de culture des clones recombinés contient la protéine exogène d'intérêt, en particulier après induction du clone à l'aide de différents inducteurs, en particulier l'acide rétinoïque, le diméthylsulfoxyde, le TPA ou de conditions de cultures spécifiques, en particulier par la formation de corps embryoïdes.

Dans ce procédé, les deux allèles du locus ciblé sont de préférence modifiés.

De plus, les cellules sont des cellules aviaires embryonnaires primaires, des cellules aviaires embryonnaires souches, en particulier les cellules embryonnaires souches issues de la mise en culture de blastodermes. Ces cellules présentent un phénotype alcaline phosphatase positive, en particulier un phénotype de cellule souche embryonnaire alcaline phosphatase positive.

Les cellules embryonnaires aviaires du procédé se caractérisent en ce qu'elles réagissent spécifiquement avec au moins un anticorps sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6. Parmi les cellules obtenues selon le procédé de l'invention, on peut citer en outre les cellules aviaires primaires de phénotype défini en particulier pour un fibroblaste primaire, une cellule épithéliale, ou une cellule endothéliale.

L'invention se rapporte également à un procédé défini ci-dessus dans lequel les cellules sont des cellules aviaires dérivées d'une cellule embryonnaire primaire et établie en lignée à l'aide de différents agents immortalisants, en particulier les cellules dérivées des cellules souches embryonnaires induites à différencier sous l'action de différents agents inducteurs en particulier l'acide rétinoïque, le diméthylsulfoxyde, le TPA ou de conditions de cultures spécifiques, en particulier par la formation de corps embryoïdes.

Alternativement, les cellules sont des cellules aviaires établies en lignée, en particulier les cellules hépatiques LMH, les cellules monocytes HD11 et les cellules fibroblastiques QT6.

Lesdites cellules définies ci-dessus peuvent être transformées en outre avec un vecteur d'expression exprimant une protéine de la famille Rad, en particulier la protéine Rad54.

Pour ce procédé, le milieu utilisé peut comprendre des anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA) et une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6 et leurs différents mélanges.

Le milieu utilisé peut également comprendre différents facteurs en particulier le SCF, l'IGF-1, le bFGF, le CNTF et l'Oncostatine.

10 Dans un troisième aspect, l'invention se rapporte à un procédé d'obtention d'un animal appartenant à l'espèce aviaire capable d'exprimer une protéine exogène d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) obtention de cellules aviaires modifiées par le procédé défini ci-dessus,
- b) introduction de la cellule obtenue à l'étape a) dans la cavité sub-germinale d'un
15 embryon, dans la circulation sanguine ou par transfert nucléaire du noyau de ladite cellule dans un ovocyte énucléé ou non énucléé, et
- c) incubation de l'embryon obtenu à l'étape b).

- par transfert nucléaire, on entend le transfert d'un noyau d'une cellule dans un œuf ou ovocyte duquel le noyau a été retiré, ou non ou encore dans lequel les chromosomes ont
20 été détruits ou altérés par irradiation gamma ou UV ou tout autre moyen adapté.

De préférence, le vecteur utilisé à l'étape a) permet une expression tissu-spécifique, en particulier dans l'oviducte, le foie, le sang, la moelle et les organes lymphoïdes.

- Par moelle, on entend le tissu qui remplit la cavité de la plupart des os et qui contient
25 les cellules souches hématopoïétiques, à partir desquelles dérivent toutes les cellules rouges et blanches du sang.

L'invention porte également sur le procédé précité pour obtenir un animal appartenant à l'espèce aviaire présentant une expression tissu-spécifique d'une protéine exogène
30 d'intérêt, caractérisé en ce que le vecteur est un vecteur de recombinaison homologue possédant parmi différents éléments constitutifs nécessaires à son fonctionnement des

bras 5' et 3' d'homologie aux séquences d'un locus donné, notamment un locus sélectionné parmi le locus de l'ovalbumine, des ovovmucoïdes, de la conalbumine et du lysozyme.

Un tel vecteur peut comprendre la séquence codante pour la protéine exogène fusionnée
5 avec au moins un élément sélectionné parmi une séquence intronique, une séquence peptide signal de sécrétion, en particulier le peptide signal du lysozyme comprenant la séquence SEQ ID No 2, une séquence poly A, un IRES et un promoteur, en particulier choisi parmi les promoteurs des gènes de l'ovalbumine, des ovomucoïdes, de la conalbumine et du lysozyme.

10

L'étape b) du procédé pour obtenir un animal appartenant à l'espèce aviaire présentant une expression tissu-spécifique d'une protéine exogène d'intérêt peut comprendre en outre la transformation des cellules aviaires avec un vecteur exprimant une protéine de la famille Rad, en particulier Rad54.

15

Dans un aspect supplémentaire, l'invention se rapporte à un procédé de production d'une protéine d'intérêt comprenant l'extraction de la protéine exogène exprimée dans les tissus d'un animal obtenu à partir du procédé évoqué ci-dessus. Dans ce procédé, la protéine est de préférence extraite du sang, du jaune ou du blanc d'œuf.

20

Alternativement, le procédé de production d'une protéine d'intérêt peut consister en l'extraction de la protéine exogène exprimée dans le surnageant des cellules issues du procédé selon l'invention.

25

L'invention a également trait à un animal appartenant à l'espèce aviaire susceptible d'être obtenu à partir du procédé décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il exprime une protéine exogène dans un tissu spécifique, par exemple dans le foie, le sang, la moelle, les organes lymphoïdes ou l'oviducte.

30

Dans un autre aspect, l'invention vise un oeuf susceptible d'être obtenu à partir d'un animal décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'une partie de ces composants, en particulier l'ovalbumine, les ovomucoïdes, la conalbumine et le lysozyme soit partiellement ou totalement remplacée par une protéine d'intérêt exogène, sélectionnée notamment

5 parmi les peptides à intérêt thérapeutique, les interleukines, les cytokines, les hormones, et les anticorps.

- Par anticorps, on entend une protéine présentant une affinité spécifique pour un antigène comprenant les anticorps polyclonaux, monoclonaux et leur fragment Fab.

10 L'oeuf de l'invention peut comporter une proportion de protéine exogène comprise entre quelques mg (1 à 10 mg) et 500 mg de matières sèches en lieu et place d'une partie ou de la totalité d'au moins une protéine endogène, choisie notamment parmi l'ovalbumine, les ovomucoïdes, la conalbumine, le lysozyme et l'avidine.

15 Des exemples non limitatifs des modes de réalisations de l'invention sont donnés ci-après

Abbreviations

- cDNA : complementary DNA
- 20 CMV : Cytomégaloïvirus
- DNA : Desoxyribonucleic Acid
- ER : Estrogene Receptor
- FGF : Fibroblast Growth Factor
- GFP : Green Fluorescent Protein
- 25 GR : Glucocorticoïd Receptor
- HRE : Hormone Responsive Element
- IGF-1 : Insulin Growth factor 1
- LPS : Lipopolysaccharides
- LTR : Long Terminal Repeat
- 30 MAR : Matrix Attachment Region
- MCSF : Macrophage Colony Stimulating Factor

NRE : Negative Response Element

PR : Progesterone Receptor

RAR : Retinoic Acid Receptor

RNA : Ribonucleic Acid

5 RSV : Rous Sarcoma Virus

RXR : Retinoïd X Receptor

SCF : Stem cell Growth factor

SDRE : Steroid Dependent Regulatory Element

TPB : Tryptose Broth Phosphate

10 TPA : TriPhrobol Ester

TR : Thyroid hormone Receptor

VDR : Vitamin D Receptor

Exemple 1 : L'œuf comme système de production

15

L'expression d'une protéine d'intérêt dans un liquide physiologique d'un animal, le poulet par exemple, notamment dans l'œuf et en particulier dans le blanc d'œuf apparaît réalisable avec l'aide de différents outils moléculaires dont les vecteurs d'expression. Le principe général de l'invention est de faire exprimer directement dans l'œuf une

20 molécule exogène d'intérêt soit sans changer l'une ou l'autre des protéines déjà présentes dans l'œuf, soit en lieu et place d'une molécule endogène ou d'une fraction de cette molécule endogène.

1.1 Les protéines du blanc

25

L'œuf est un milieu particulièrement adapté pour l'expression de molécules exogènes. Le blanc d'œuf est un milieu complexe dont la composition biochimique est assez bien caractérisée (voir Tableau 1 ci-après).

Tableau 1 : Teneur moyenne (en g) pour un œuf de 60g

30

	Œuf entier	blanc	Jaune
Eau	40	31	9
Matière sèche	20	4	10

Protéines	6,9	3,6	3,2
Lipides	6,4	<0,2	6,4
glucides	0,2	0,2	< 0,1

D'après Sauveur, 1988 op cité

Pauvre en lipides (0,02%), en ions inorganiques et en glucides (0,5% dont du glucose libre), le blanc est composé principalement d'eau à 88 %, et de protéines en solution (11,5%). Les protéines du blanc d'œuf sont bien caractérisées dans leur ensemble, même si leur nombre exact est encore soumis à variation (Stevens, 1991; Li-Chan and Nakai, 1989; Sauveur, 1988). On s'accorde en général pour avoir identifié environ 40 protéines différentes. Parmi celles-ci, on distingue cinq protéines majoritaires (ovalbumine, conalbumine, ovomucoïde, ovomucine a and b et le lysozyme) qui représentent à elles seules près de 83-84% des protéines du blanc. Au regard de cette composition et d'un poids moyen de matière sèche de 6-7 g environ, ces protéines majoritaires représentent donc l'équivalent de 4,8-5,6 g environ. Les protéines mineures, mais significativement détectables représentent de 5 à 6% des protéines totales. Parmi ces composants minoritaires, on peut citer l'avidine, très connue dans le monde du diagnostic pour sa très haute affinité et sa très grande spécificité vis à vis de la biotine. Les autres composantes sont identifiées dans des proportions faibles, variables d'une préparation à une autre et sont souvent mal caractérisées tant au niveau biochimique que moléculaire. Le nombre d'études les concernant est d'ailleurs peu important en accord avec leur faible représentativité. Les propriétés physicochimiques des protéines majoritaires du blanc d'œuf sont présentées (voir Tableau 2 ci-dessous).

Tableau 2 : Composition protéique du blanc d'œuf de poule

Protein	% of protein	MW	pI	% carb	Function	AA	S-S
Ovalbumin	54	45.0	4.5	3.5	Structural	385	1
Conalbumin	12-13	77.7	6.0	2.6	Iron transport	686	15
Ovomucoïd	11	28.0	4.1	16	Proteinase inhibitor	185	9
Ovomucin a Ovomucin b	1.5-3.5	210 720	4.5	13 58	Structural	1276 246	

Lysozyme	3.5	14.3	10.7	0	Proteolytic enzyme	129	4
Ovoinhibitor	0.5-1.5	49.0	5.1	5-9.6	Proteinase inhibitor		21
OvoGlycoprotein	0.5-1.0	24.4	3.9		?		
Ovoflavoprotein	0.8	32.0	4.0	11	Riboflavin transport	234	9
Ovostatin	0.5	780	4.9	5.8	Proteinase inhibitor	2762	
OvoGlobulin G2	>1	47	4.9	?	?	102	
OvoGlobulin G3	>1	50	4.8	?	?	103	
Cystatin	0.05	12.7	5.1	0	Proteinase inhibitor	124	2
Avidin	0.05	68.3	10	7	Biotin transport	4x129	4x1
Thiamin binding protein	<0.05	38		0	Thiamin transport		
Autres protéines	9						

D'après : Stevens (1991), Comp. Bioch. Physiol 100b 1-9 and Li-Chan and Nakai (1989), Critical review in Poultry Biology 2, 21-58.

- 5 Les protéines du blanc sont toutes élaborées par les cellules de l'oviducte, au niveau du magnum. Différents types cellulaires sont trouvés et une certaine spécialisation est observée entre les cellules, responsables de la sécrétion. Les cellules épithéliales calciformes (appelées également cellules à mucus) sont spécialisées dans la production de l'avidine et de l'ovomucine, tandis que les cellules des glandes tubulaires sécrètent
- 10 préférentiellement le lysozyme et l'ovalbumine. La répartition de ces différents types cellulaires est variable dans l'épithélium sécrétoire du magnum, mais aucune régionalisation n'est observée (Sauveur, 1988).

La synthèse des protéines du blanc est continue au niveau des cellules. Les cellules épithéliales glandulaires et calciformes 'stockent' les protéines, qui sont déchargées

15 autour du jaune lors du transit dans le magnum en quelques heures (environ 3h30). La déformation mécanique induit cette sécrétion et ce dépôt très rapide (Sauveur, 1988).

Ainsi, il apparaît essentiel pour le bon déroulement de la sécrétion des protéines exogènes dans le blanc de l'œuf de maintenir tous ces signaux de régulation, au niveau

20 moléculaire et physique.

Au niveau d'un animal chimérique, le préalable à toute production d'une molécule exogène d'intérêt est la présence de la modification génétique dans l'oviducte et dans les cellules du magnum en particulier. L'approche privilégiée de l'utilisation des cellules souches embryonnaires semble permettre ce mosaïcisme. Au niveau de
5 l'établissement d'une lignée d'animaux, cette contribution est transmise de façon automatique à l'état hétérozygote puis homozygote par les croisements adéquats, car intégrée au niveau du génome.

1.2 Les composants du jaune

10 Le jaune d'œuf est essentiellement composé d'une accumulation de lipides (Tableau 1 ci-dessus) sous forme de lipoprotéines. Il est le résultat d'une étroite association des deux protéines majoritaires, la vitelline et la vitellenine, avec des phospholipides et des triglycérides. Les autres composants (cholestérol, vitamines et pigments liposolubles) sont minoritaires. A contrario des protéines du blanc, toutes les protéines et les
15 composants du jaune sont synthétisés par le foie et transportés via la circulation sanguine pour s'accumuler au niveau du jaune lors du développement des follicules (Sauveur, 1988 ; Nau, 1987). On trouve également dans le jaune une proportion non négligeable d'immunoglobulines qui sont accumulées directement au cours de l'élaboration de ce vitellus. La présence de ces immunoglobulines d'origine maternelles
20 assure d'ailleurs une certaine protection immunitaire au cours des premiers jours, voir plus, de la vie du poussin. Le mécanisme de transport de ces immunoglobulines et leur accumulation dans l'œuf commence à être étudié. Le processus de purification de ces molécules IgY spécifiques de l'oiseau (équivalentes aux IgG des mammifères) est bien maîtrisé. Cette propriété peut être mise à profit pour obtenir des immunoglobulines
25 aviaires en quantité relativement importante (parfois de l'ordre de 10 mg par œuf), voir d'en favoriser l'accumulation par une immunisation ciblée de l'animal en ponte. Il a été par ailleurs montré que les immunoglobulines humaines peuvent également s'accumuler dans le jaune, par un mécanisme similaire aux immunoglobulines endogènes (Mohammed et al., 1998). Dans cette optique de faire produire par la poule des
30 immunoglobulines particulières, une stratégie d'expression spécifique peut être développée.

Exemple 2 : Description des loci moléculaires et leur régulation transcriptionnelle

La plupart des gènes qui spécifient les protéines majoritaires du blanc d'œuf ont été
 5 étudiés au niveau moléculaire. Les phases codantes sont en général identifiées et la
 plupart des séquences des cDNAs correspondants se trouvent dans les banques de
 données. Au niveau génomique, les progrès ont été plus lents. La structure des loci de la
 plupart des molécules majoritaires a été publiée complètement ou partiellement.
 Néanmoins, les séquences publiées peuvent se révéler incomplètes (voir Tableau 3 ci-
 10 dessous).

Tableau 3 : Séquences identifiées des protéines du blanc d'œuf

	cDNA	gene	gene (partiel)
Ovalbumin	V00383	J00895	
Ovalbumin X			J00917 5' ex1, J00918 ex5, J00919 ex6, J00920 ex7
Ovalbumin Y		J00922	
Conalbumin	X02009	Y00407	
Ovomucoid	J00902		J00897 (5'), J00898 (3' coding) J00899 (3' non cod)
Ovomucin □	AB046524		
Lysozyme	X61198	X98408 X00589 X00591 X05461 X05463 X05462	J00882 5' ex1 J00883 ex2 J00884 ex3 J00885 ex4 3'

Ovoinhibitor (16 exons)			M15962 ex1, M16127 ex2, M16128 ex3 M16129 ex4, M16130 ex5, M16131 ex6 M16132 ex7, M16133 ex8, M16134 ex9 M16135 ex10, M16136 ex11, M16137 ex12 M16138 ex13, M16139 ex14, M16140 ex15 M16141 ex16
Ovostatin	X78801		
Cystatin	J05077	M95725	X62413 (synthetic mut V55D) X62411 (synthetic mut Q53N S56A) X62412 (synthetic mut R52L Q53E) X62409 (synthetic mut Q53N) X62408 (synthetic mut Q53E) X62407 (synthetic mut L54M G57A) X62410 (synthetic mut Q53N G57C) X62406 (synthetic mut G57A) X14685 (1-23 S1M I29 L89)
Avidin (Avd) Avr1 Avr2 Avr3 Avr4 Avr5 Avr6 Avr7	X05343	AJ311647 AJ311647 AJ311648 AJ237658 AJ237659	Z21611 Z21554 Z21612 Z22883 Z22882

2.1 Locus de l'ovalbumine

Le locus de l'ovalbumine d'une taille de 100 kb appartient à la famille multigénique des serpins et contient 3 gènes apparentés, ova, ovaX et ovaY. Ils sont tous exprimés dans l'oviducte d'une poule en ponte (LeMeur et al., 1981; Baldacci et al., 1981). Connu structurellement depuis 1979 par des études de microscopie électronique (Gannon et al, 1979), le locus de l'ovalbumine est situé sur le chromosome 2 (Dominguez-Steglich et al., 1992). La première séquence complète qui a été publiée en 1978 est celle de

l'ovalbumine. Son pré-mRNA a une taille de 7564 bp et comprend 7 exons (McReynolds et al., 1978). Le messenger épissé fait 1872 bp (Woo et al., 1981).

La transcription du gène codant pour l'ovalbumine (comme celui de la conalbumine d'ailleurs- cf2.3) est contrôlée par les hormones stéroïdiennes. Ainsi, l'addition
5 d'estrogènes stimule de 20 fois la production d'ovalbumine et de 2,5 fois celle de conalbumine (N'guyen et al. 1979). Avant stimulation hormonale, les transcrits de l'ovalbumine ne sont pas détectables dans les cellules de l'oviducte, alors qu'ils représentent, proportionnellement à la dose d'estrogène, plus de 50% des transcrits totaux d'une cellule après stimulation maximale (Dean et al., 1983). Si le taux de
10 transcription de la conalbumine est directement proportionnel à la quantité des récepteurs aux estrogènes dans le noyau, celui de l'ovalbumine indique qu'il existe plusieurs sites de fixation des récepteurs aux estrogènes au niveau du promoteur (Palmiter et al, 1981). La structure nucléosomique des gènes de l'ovalbumine et de la conalbumine se modifie au cours de l'activation transcriptionnelle. Les fragments
15 génomiques s'associent à la matrice nucléaire et présentent quatre régions majeures d'hypersensibilités à la DNase, suite au traitement des hormones (Ciejek et al., 1983). Ces régions sont localisées dans la région 5' du promoteur et en 3' du dernier exon au niveau du site de polyadénylation (Bellard et al., 1982 ; Bellard et al., 1986) (Figure 1 : Eléments de régulations du gène de l'Ovalbumine). En association avec les estrogènes,
20 différentes hormones stéroïdes (progestérone, glucocorticoïdes ou androgène) et différents facteurs (Insuline, IGF-1, cAMP, ...) sont également impliqués dans le contrôle transcriptionnel. L'ensemble de ces facteurs augmente surtout la demi vie du mRNA de l'ovalbumine, demi- vie qui passe de 6h à 24 h après addition de certains de ces facteurs (Arao et al., 1996; Kida et al., 1995; Evans and McKnight, 1984). Ces
25 facteurs augmentent également le taux de traduction du messenger (Skafar et al., 1985; Skoufos and Sanders, 1992).

Les résultats des nombreux travaux réalisés avec le promoteur de l'ovalbumine ont permis de dégager les différentes régions nucléotidiques cibles de l'action de ces hormones et facteurs (Sensenbaugh and Sanders, 1999). Des travaux de délétions
30 successives au niveau du promoteur et des expériences de transfection de différentes constructions montrent que l'activation du promoteur est optimale dans les cellules

primaires d'oviducte de poule, en présence ou non d'estrogènes. La présence d'activateurs et de répresseurs tissus spécifique est donc essentielle pour l'expression de ce gène (Dierich et al., 1987). La Figure 1 illustre les principaux sites de régulations identifiés.

- 5 On trouve ainsi successivement une région HSIV vers -6000 bp par rapport au site d'initiation de la transcription qui ne présente pas d'éléments de réponse aux estrogènes. Une région HS III, localisée entre -3200/-2800 bp par rapport au site d'initiation de la transcription comprend les sites majeurs de régulations par les estrogènes. La délétion de cette région abolie la plus grande partie de la réponse HSIII, médiée par quatre
- 10 séquences répétées de demi ERE, séparées les unes des autres par une centaine de nucléotides. Ces éléments coopèrent avec le site TATA box, situé à proximité. Chaque site fixe faiblement un récepteur, mais la coopération des différents sites assure un caractère inductible fort, dans un environnement de promoteur minimum ou hétérologue. Cette même région montre des éléments inhibiteurs de l'expression du
- 15 gène, éléments actifs dans les cellules non productrices, mais dans une situation hors de l'oviducte (Kato et al., 1992; Muramatsu et al., 1995).

- La région HS II comprend le SDRE (Steroid Dependent Regulatory Element), localisée entre - 800 à -585 bp, par rapport au site (+1), de démarrage de la transcription. Cette région présente des homologies avec le promoteur du gène NF-kappa B, suggérant des
- 20 contrôles par des facteurs communs (Schweers et Sanders,, 1991). Plusieurs facteurs de la famille des protéines W-H, les protéines Chirp-I, Chirp II, Chirp III (Chicken ovalbumin Induced Regulatory Protein I) se fixent également sur le SDRE uniquement en présence d'estrogène et de glucocorticoïdes (Dean et al., 1996 ; Dean et al., 1998; Dean et al., 2001). A nouveau, comme pour montrer la complexité des régulations
- 25 mises en jeu, la seule présence de cette région SDRE au sein d'un promoteur hétérologue ne conduit pas à une réponse dépendante des hormones stéroïdes. Toutefois, cette région devient dépendante de ces hormones, si elle est associée avec la région HSI.

- Cette région HS I, localisée de -350 à -32, est la région NRE (Negative Response
- 30 Element) qui contrôle la principale régulation négative du promoteur. NRE réprime l'expression du gène en absence d'hormones stéroïdiennes. La présence de NRE seul ou

de SDRE seul ne suffit pas pour réguler un gène exogène. Ces séquences doivent coopérer pour 'induire la dérepression' (Hasty et al., 1994 ; Schweers et al., 1990; Sanders et McKnigh, 1988). Mais la vision est simpliste, car cette région HSI est en fait constituée d'une véritable mosaïque de sites assurant une régulation positive et négative de la transcription du gène. Trois domaines sont discernables quant à l'influence de leurs effets. Domaine I : La région -239 à -220 est une séquence de type silencieux. Les trois zones présentent de l'affinité pour des complexes protéiques spécifiques des cellules de l'oviducte mais les plus importantes sont les régions -280 à -252 et -134 à -88. Cette région porte le motif CAR (COUP Adjacent repression). La région appelée NRE est en fait plus complexe qu'initialement décrite (Haecker et al., 1995). Un site de régulation positif qui fixe le facteur delta EF1 (Estrogen responsive transcription factor) a aussi été identifié. Ainsi, les sites d'interaction (-197 à -95) de la progestérone et des estrogènes se chevauchent partiellement (Dean et al., 1983; Dean et al., 1984). En aval de la position de -95 bp, des délétions supplémentaires font chuter dramatiquement les taux des transcrits observés (Knoll et al., 1983). Outre les récepteurs aux estrogènes, un des facteurs régulateurs important est le récepteur orphelin COUP-TF, (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor) (Sawaya et al., 1996 ; Robinson et al., 1999). Ce facteur est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus. Identifié par co-purification avec le récepteur aux Estrogènes, il présente de l'affinité avec une région située entre -90 et -70 bp (Wang et al., 1987; Hwung et al., 1988a, Hwung et al., 1988b; Monroe and Sanders, 2000). La formation de complexes récepteur-récepteur entre COUP-TF et les différents récepteurs aux hormones nucléaires (VDR, ER, TR, GR, PR, RXR, HNF-4...) au niveau des différents HRE, dont le ERE, favorise les fixations à ces éléments de régulations. COUP-TF régule l'action de ER par des contacts directs avec le DNA mais aussi via des interactions directes protéines - protéines entre récepteurs (Klinge et al., 1997). Les modes d'action de COUP-TF et des différents récepteurs apparentés (COUP-TFII ou ARPI) sont complexes (Kimura et al., 1993) dans un sens positif ou négatif pour la régulation de la transcription selon les partenaires protéiques en jeu. Parmi les protéines impliquées, on peut citer de façon non exhaustive ear2, (Pereira et al., 1995) ; N-CoR (Nuclear Repressor Coreceptor) et

SMRT (Silencing Mediator for retinoic acid et Thyroid hormone Receptor), (Shibata et al., 1997).

2.2 Le locus du lysozyme

5 Le locus du lysozyme est un locus plus restreint en taille que celui de l'ovalbumine. Il est estimé à environ 40 kb (Sippel et al., 1978 ; Short et al., 1996). Deux unités MAR (Matrix Attachment Region) situées à -11.1 kb / -8.85 kb et +1.3 kb à +5.0 kb, situées par rapport au site (+1) de l'initiation de la transcription délimitent plus précisément ce locus à 22 kb. Ces séquences MAR sont composées de plusieurs sites d'accrochage à la
10 matrice protéique de la membrane nucléaire (Loc and Strätling, 1988; Phi-van and Strätling, 1996 ; Phi-van, 1996). L'ajout de séquences MAR, à des gènes hétérologues, augmente leur transcription (Stief et al., 1989; Phi-Van et al., 1990). En sus de la présence des MAR, il y a au moins une origine de réplication du DNA dans le locus du lysozyme, origine qui contient plusieurs fourches d'initiation de la réplication (Bonifer et
15 al., 1997; Phi-van et al., 1998 ; Phi-van and Strätling, 1999). Ce point semble d'ailleurs rendre le locus du lysozyme tout à fait particulier en terme de clonage, certaines parties étant assez difficile à sous cloner dans des plasmides de clonage. Le gène du lysozyme chez le poulet comprend 4 exons et présente une homologie importante avec les gènes du lysozyme humain et murin. Plusieurs sites secondaires initiateurs de la transcription
20 ont été mis en évidence, en général situés dans des séquences répétées réparties sur l'ensemble du locus (Von Kries et Strätling, 1988). Des séquences régulatrices de l'expression ont été identifiées de -14 kb à + 6 kb, soit sur toute la totalité du locus. Le gène du lysozyme est exprimé de façon constitutive dans les macrophages matures, cellules dans lesquelles le lysozyme est utilisé comme marqueur de différenciation,
25 alors que son expression est placée sous le contrôle des hormones stéroïdiennes dans les cellules de l'oviducte (Short et al., 1996 ; Fritton et al., 1987 ; Jantzen et al., 1986 ; Fritton et al., 1983). Ces spécificités d'expression sont dépendantes de différentes séquences dont les principaux sites sont portés sur la figure 2 : Eléments de régulations du gène du lysozyme.

On distingue deux catégories de séquences régulatrices : les séquences de régulation dites positives ou 'enhancers' et les séquences de régulations dites négatives ou 'silencers'. Ces séquences ont été identifiées comme les régions 'hypersensibles' suite à l'analyse des profils électrophorétiques du DNA, profils obtenus après traitement à la
5 DNase I .

Les principaux sites enhancers et silencers sont respectivement les régions E-6.1kb, E-2.7kb, E-0.2kb et N-2.4kb, N-1.0kb et N-0.25kb. Certains sont spécifiques des cellules myéloïdes (E-6.1 kb, E-2.7kb, E-0.2kb pour les macrophages matures et N-2.4 kb dans
10 les fibroblastes et les macrophages immatures), (Steiner et al., 1987; Huber et al., 1995). Dans les cellules de l'oviducte actif l'élément E -6.1 kb assure l'essentiel de la spécificité. L'activation séquentielle de l'ensemble de ces différents sites est également un élément de régulation cellule et tissu spécifique (Regenhard et al., 2001 ; Kontaraki et al., 2000). Plus en détail, l'enhancer E-2.7kb est composé de 4 régions (I à IV). La
15 région I fixe le facteur FEF (c-fes Expression Factor), la région II contient un site de reconnaissance du facteur PU.1, de la famille EST et est spécifique des macrophages (Ahne et Strätling, 1994). Tous ces différents éléments de régulations se chevauchent partiellement, au moins dans le gène du poulet, mais pas au niveau du gène de la souris, espèce dans laquelle une duplication ancestrale a séparé le gène et ses éléments de
20 régulation. D'autres éléments ont été localisés, notamment les sites de fixation de facteurs de transcription ubiquitaires comme NF-1, mais aussi AP1 situé en - 0.2 kb et - 6.1 kb, site pour lequel une région de 157 bp assure la spécificité d'expression dans les macrophages (Goethe et al., 1994 ; Theisen et al., 1986; Grewal et al., 1992; Nowock et Sippel, 1982). De façon intéressante, l'oncogène v-myc (présent dans les cellules HD11
25 par exemple) et inhibiteur de la différenciation des monocytes en macrophages bloque la transcription en inhibant la fixation du facteur C/EBP (Mink et al., 1996).

Les éléments (HRE) assurant la sensibilité de la transcription aux hormones stéroïdiennes (PRE pour la progestérone, et GRE glucocorticoïdes) sont présents dans la région située à - 0.2 kb du site (+1), d'initiation de la transcription du promoteur
30 (Renkawitz et al., 1982 ; Renkawitz et al., 1984a ; Renkawitz et al., 1984b; Hecht et al., 1988). Plus particulièrement, deux sites entre -220 et - 140 bp et entre - 80 à - 50 bp

assurent l'essentiel de la régulation (Altschmied et al., 1989; Dolle and Strätling, 1990; Von der Ahe et al., 1986).

Une part importante de la régulation est contrôlée par les 'silencers'. Deux d'entre eux
5 (N-1.0kb et N-0.25 kb) inhibent la transcription, même de promoteurs hétérologues
(Baniahmad et al., 1987 ; Faust et al., 1999). Le troisième (N-2.4 kb) est reconnu par les
récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) et par son homologue oncogénique v-
erbA, ainsi que par le régulateur NeP1 (negative Protein 1) encore appelé CTCF
(CCCTC-binding factor, (Burcin et al., 1997; Darling et al., 1993; Kohne et al., 1993 ;
10 Bhat et al., 1994). NeP1 se fixe au niveau de la partie F1 de 50 bp de N-2.4 alors que le
TR principalement sur la partie F2 de cet élément. Les associations homodimériques ou
hétérodimériques avec les autres récepteurs nucléaires (RAR, RXR) modulent le niveau
de transcription de ce gène (Baniahmad et al., 1990; Arnold et al., 1996). L'état de
phosphorylation du récepteur TR est également un élément important. Enfin, le facteur
15 HNF-I alpha (Hepatic nuclear Factor-I) qui est exprimé dans les cellules de l'oviducte a
un rôle dans la régulation du gène lysozyme. Le promoteur du gène contient deux
régions reconnues par cette protéine HNF-I. Cette régulation de l'expression du gène du
lysozyme par le NHF-I semble avoir été perdue au niveau phylogénétique entre les
oiseaux et les mammifères (Grajer et al., 1993).

20

2.3 Le locus de la conalbumine

Le gène de la conalbumine, encore appelé ovotransferrine a été identifié d'abord chez
l'homme. Il s'étend sur au moins 33.5 kbp et comprend 17 exons. Le gène poulet est
également organisé en 17 exons et 16 introns mais sur 10,5 kb seulement. Le messenger a
25 une taille de 2376 bp (Cochet et al., 1979 ; Jeltsch and Chambon, 1982; Jeltsch et al.,
1987; Schaeffer et al., 1987). Très peu d'études de la régulation de l'expression de ce
gène ont été réalisées. La régulation de la stabilité du messenger est particulière. La
molécule qui s'apparente à la famille des transferrines, fixe le fer sous forme ionique et
régule la stabilité et le niveau de transcription de son propre messenger. Si beaucoup
30 d'études ont été réalisées sur la transferrine humaine et son récepteur (CD71), peu de
documentation existe quant aux formes aviaires.

Exemple 3 : Eléments extérieurs facilitateurs

Chez les eucaryotes, la recombinaison homologue est un événement naturel qui se produit surtout au moment de la méiose, afin d'assurer, dans un énoncé simpliste, un brassage des gènes et des allèles. Le rôle de la recombinaison homologue est beaucoup plus délicat à interpréter lors d'une division mitotique. Les phénomènes de recombinaisons homologue et non homologue semblent néanmoins cruciaux dès que le matériel génétique est endommagé. De nombreuses situations dans la vie d'une cellule et d'un organisme expose ainsi le matériel génétique. Par exemple, un défaut soudain de réplication, une ionisation radicalaire liée à des radiations, un stress oxydatif, l'action d'endonucléases ou de topoisomérases, le stress mécanique lié à la ségrégation mitotique, peuvent induire des coupures double brins accidentelles. Si la levure privilégie les mécanismes de réparation homologues, la cellule eucaryote supérieure semble privilégier le raboutage non homologue de ces coupures, même si la réparation homologue est aussi observée. Mais dans tous les cas, comme l'intégralité génétique est un préalable à toute division, pour faire face à cette situation critique de matériel endommagé, la cellule met en route tout un ensemble de gènes, chargés de réparer ces coupures. Décrits initialement dans le système levure, les gènes Rad (rad51, rad52, rad53 et rad54) (Takata et al., 2000 ; Morrison and Takeda, 2000; Bell et al., 1999 ; Shinohara et al., 1997; Bezzubova et al., 1997; Ivanov and Haber, 1997; Porter et al., 1996) impliqués dans la réparation par recombinaison homologue ont été identifiés aussi dans les organismes supérieurs. Les homologues Rad51 et Rad54 de poulet ont été clonés. L'ADN et la protéine présentent de fortes homologies avec les séquences de levure, souris et humain (Essers et al., 1997 ; Dronkert et al., 2000). Des similitudes d'action sont alors observées, mais aussi des différences, notamment en ce qui concerne l'action de Rad 51 (Bezzubova et al., 1993). De même, les homologues humains des gènes ku70 et ku86 de levure interviennent à la fois dans les réparations non homologues, et dans les phénomènes de recombinaison observés dans les réarrangements des loci d'immunoglobulines. Les relations entre ces différents acteurs commencent à être également approchées et mettent en évidence la formation de

complexes protéiques dont les régulations sont elles mêmes complexes (Morrison et al., 2000 ; Morrison et al., 1999 ; Yamaguchi-Iwai et al., 1999 ; Takata et al., 1998 ; Yamaguchi-iwai et al., 1998). Ainsi, une liste non exhaustive de protéines facilitant la recombinaison (recombinase) peut être donnée, de la simple protéine bactérienne RecA
 5 (Shcherbakova et al., 2000), aux membres de la famille Rad, mais aussi à de protéines telles que BraC1 (Moynahan et al., 1999).

Dans une approche qui faciliterait des événements de recombinaison homologue, l'action de Rad 54 est évaluée au moment de l'introduction du vecteur de recombinaison homologue. Ainsi, deux approches sont possibles. La première consiste à
 10 effectuer une co-transfection d'un vecteur d'expression d'une des protéines de la famille Rad, en particulier Rad 54 avec le vecteur de recombinaison homologue. La seconde consiste à transfecter les cellules avec un vecteur d'expression conditionnelle d'une des protéines de la famille Rad, en particulier Rad 54. Dans ce cas, les cellules sont d'abord sélectionnées, stabilisées et établies pour être à nouveau transfectées avec un vecteur de
 15 recombinaison homologue, puis induites pour exprimer au maximum la protéine de la famille Rad. L'action de Rad54 testée au niveau de l'efficacité de transfection est présentée dans le tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4 : Influence de l'expression de Rad 54 sur le nombre de clones en
transfection

Conditions	1	2	3	4	5	Témoin
ppréOva RH (µg)	5	5	5	5	5	0
pMCS5 (µg)	5	4	3	2	0	10
pRad54 (µg)	0	1	2	3	5	0
Fugène	30	30	30	30	30	30
DMEM	970	970	970	970	970	970
Nb de clones						
Boite 1	344	304	172	248	292	0
Boite 2	128	324	212	264	300	0
Moyenne	236	314	193	256	296	0

Afin de tester l'importance d'une des protéines de la famille Rad, le plasmide d'expression pRad54 (plasmide d'expression de la protéine RAD54 sous contrôle du promoteur CMV) est co-transfecté en présence du plasmide pOvaRH, plasmide de recombinaison ne contenant pas de cDNA d'intérêt. La quantité totale de plasmide est de 5µg de pOvaRH, en présence de quantités variables de pRad54. Le complément molaire étant apporté par un plasmide 'carrier', le pMCS5 d'origine commerciale, a peu près de même taille que le pCMV Rad54. Les cellules souches S86N sontensemencées à 1×10^6 cellules par boîte dans du milieu de prolifération en présence de feeder inactivé par irradiation. Le mélange de transfection est ajouté et la sélection à la néomycine appliquée pendant 7 jours environ. Les clones sont alors dénombrés après fixation au méthanol et coloration au Wright/Giemsa. En conclusion, la présence de Rad54 ne semble pas modifier sensiblement l'efficacité d'obtention de clones.

Exemple 4 : Choix du signal peptide

Une des approches choisies pour produire les protéines exogènes est leur accumulation dans l'œuf. La stratégie de substitution remplacement utilisée dans le cadre de l'invention rend utile l'utilisation d'un système actif (mais éventuellement passif pour des protéines spécifiques qui en auraient la capacité) d'accumulation de la protéine exogène dans le blanc de l'œuf. Ainsi, les phases codantes sont placées sous la dépendance du promoteur endogène du gène ciblé endogène et sont fusionnées avec un signal peptide de référence. La fonction du signal peptide est d'assurer la translocation de la protéine vers l'extérieur de la cellule à travers les différents éléments constitutifs de l'appareil sécrétoire de la cellules (réticulum, Golgi....). Les peptides signaux sont destinés à être clivés au cours du processus de maturation de la protéine. Celle ci s'accumule ensuite dans le liquide physiologique et dans le blanc d'œuf en particulier. On utilise soit les peptides signaux des protéines endogènes, soit des peptides signaux d'autres molécules, séquences connues pour être correctement traitées. Notamment, le peptide signal du lysozyme est choisi de façon préférentielle car sa structure est bien connue et les 18 premiers acides aminés sont clivés lors de l'exportation de la protéine

mature dans le blanc de l'œuf. De plus, ce peptide signal appartient à une protéine naturellement accumulée dans le blanc de l'œuf.

Parmi les autres peptides signaux utilisés, on trouve ceux des interleukines, ceux de certains récepteurs membranaires, ceux de facteurs de croissance sécrétés par différents types cellulaires, ceux d'autres protéines connues pour être sécrétées dans différents systèmes biologiques. La liste n'est pas limitative.

Exemple 5 : Construction des vecteurs de recombinaison

10 5.1 Obtention des éléments intermédiaires

- cassette pCMV Néo polyA

Le plasmide commercial pCI Néo (Promega, Madison, US) est ouvert par digestion HindIII et ligaturé sur lui-même en intra moléculaire pour donner le plasmide pCI Néo (Δ HindIII) qui place le gène de la néomycine phosphotransférase sous la dépendance directe du promoteur CMV. Le polyA d'origine est conservé.

- Préparation des cDNAs d'intérêt

Les cDNAs d'intérêt sont préparés par amplification PCR avec

- un oligonucléotide Sma-3'incDNA S contenant le site SmaI, la partie 3' de l'intron artificiel du vecteur commercial pCINéo et le début de la séquence spécifique du cDNA en 5', en ayant omis l'ATG du cDNA, afin de brancher directement le cadre de lecture du cDNA d'intérêt en phase avec celui de l'ovalbumine ou du lysozyme.

- Un oligonucléotide cDNA-SmaI AS contenant le site SmaI et la région 3' du cDNA d'intérêt, en omettant éventuellement un polyA endogène cDNA et l'oligonucléotide 3' contenant la séquence spécifiques du cDNA et le site SmaI.

Le fragment PCR amplifié est hydrolysé par SmaI (sous réserve de l'absence de ce site dans le cDNA) et cloné en SmaI dans un vecteur pMCS5 (Mobitech, Allemagne) dans lequel une séquence polyA de 277 bp a été préalablement sous clonée en XbaI/XhoI. Cette séquence polyA est elle même issue d'une hydrolyse par XbaI/XhoI du vecteur pIRESHygro (Clontech). L'orientation du fragment est alors contrôlée par simple digestion avec la carte fournie du cDNA d'intérêt.

En cas de présence d'un site de restriction SmaI dans le cDNA d'intérêt, le fragment PCR amplifié est soumis à l'action de la T4 DNA polymérase pour rendre les extrémités franches et directement cloné dans le vecteur pMCS5 ouvert en SmaI (bout franc).

5 5.2 Obtention des fragments génomiques

L'ADN génomique d'embryons de 6 à 9 jours de différentes souches dont la souche CNR (Cou Nu Rouge) et la souche S86N, est extrait soit selon une méthode classique avec un tampon de lyse SDS Protéinase K, suivi d'extractions au phénol et phénol chloroforme, soit à l'aide d'un kit de préparation (kit Proméga, ou Quiagen par exemple). Les différents protocoles donnent des rendements et des qualités de DNA compatibles avec leur utilisation respectivement la préparation d'une banque d'ADN génomique et une obtention de fragment PCR par amplification directe.

Dans le premier cas, l'ADN génomique est digéré partiellement par l'enzyme Sau3AI et les extrémités générées remplies par la polymérase Klenow en présence de deux des quatre nucléotides nécessaires à la synthèse. Il en résulte un remplissage partiel, afin de prévenir la formation d'inserts concatémères. Les inserts ainsi partiellement remplis sont insérés par ligation dans le vecteur λ -GEM-12. Les vecteurs résultants de cette opération sont empaquetés dans des capsides de phages. A titre d'exemple, 3 isolats indépendants ont été générés et leur titre déterminé, chaque isolat titre à 3×10^6 pfu/ml environ. La qualité de la banque a été vérifiée par l'étude de quelques inserts pris au hasard. Avec une sonde ovalbumine, obtenue par PCR génomique avec des oligonucléotides choisis à partir de la séquence publiée (Tableau 3), le criblage des phages permet d'obtenir des inserts, sous clonés en vecteurs plasmidiques pBS SK+ pour donner le plasmide #72. Ces inserts soumis à une cartographie de restriction (dont EcoRI et BamHI) ont été ensuite séquencés. Une comparaison entre le gène publié (réf J00895 et Tableau N°3) et les deux bras 5' et 3' du vecteur preRH ainsi que les fragments du clone #72 montrent que les homologies sont extrêmement élevées au niveau nucléotides. Seuls, deux segments localisés au niveau des introns 6 et introns 7 présentent de faibles variations réparties sur quelques dizaines de nucléotides (résultat non montré). Cette comparaison démontre la grande conservation de ce gène entre les souches analysées.

Dans le deuxième cas, différents oligonucléotides obtenus à partir de la séquence publiée (Tableau 3 ci-dessus) sont utilisés pour obtenir par PCR génomique les fragments donnant les bras 5' et 3' des vecteurs.

5

- Pour le bras 5' du vecteur pOvaRH, les oligonucléotides OvaL 2995 S et OvaL 80 AS, situé respectivement à - 2995 bp et à + 80 bp par rapport à l'ATG du gène de l'ovalbumine amplifient une région de 3075 bp, qui, soumise à l'hydrolyse par NcoI, libère un fragment de 2860 bp. Parallèlement, à partir de la séquence qui spécifie le peptide signal du lysozyme, un fragment appelé lyso 1-18 – intron est préparé par amplification PCR sur le locus du lysozyme avec les oligonucléotides Lyso 1-18 et GE-IN-AS. Ce dernier oligonucléotide contient les 30 bp de l'intron artificiel du plasmide pCINéo. Les deux fragments (Ova5' et Lyso1-18 intron) sont hydrolysés indépendamment par NcoI, purifiés puis ligaturés ensemble et l'amplification sur le produit de ligature avec les oligonucléotides OvaL 2995 S et GE-IN-AS donne le fragment Ova5' Lyso 1-18 de 3050 bp. Ce produit PCR est ligaturé avec des adaptateurs EcoRI, qui permettent de cloner cet ensemble soit dans le vecteur pBSK au site EcoRI soit dans le pMCS5 digéré en bout franc par EcoRV.
- 10
- 15
- 20 Une dernière hydrolyse de ce fragment Ova5'Lyso1-18 par Bst981 e AscI libère le plasmide coupé et un petit fragment de 220 bp en amont du fragment ova5'. Cette petite délétion permet de dessiner deux oligonucléotides Ova5'.1S et Ova5'.2S utilisés ultérieurement pour le criblage des événements de recombinaison.
- 25 Le plasmide coupé est soumis à l'action de la polymérase Klenov afin de rendre les bouts francs avant d'être ligaturé avec des adaptateurs AscI et ligaturé de façon intramoléculaire. Il en résulte un plasmide pOvaLyso, qui contient en amont du bras Ova5' un site unique, qui permettra une linéarisation du vecteur final.
- 30 Pour le bras 3' du vecteur pOvaRH, l'amplification de la région avale située entre les positions + 1657 et +7707 par rapport à l'ATG du gène de l'ovalbumine avec les

oligonucléotides OvaL 1657 S et OvaL7707 AS donne un fragment d'une taille de 6050 pb. Ce fragment a été sous cloné au site EcoRV de pMCS5 pour générer le plasmide pMCS5-Ova3' sens et pMCS5-Ova3' antisens. A partir du plasmide pMCS5-Ova3' antisens une digestion par HpaI (bouts francs) et NarI (5' sortant) permet d'obtenir le
5 fragment de 6kb, qui est sous cloné dans pBS-SK aux sites ApaI (rendu bout franc) et AccI (compatible avec NarI) pour donner le plasmide pBS-SK Ova3'.

Pour le bras 5' du vecteur pLyso RH, les amplifications proximales avec les oligonucléotides lyso 1789 S et GE-IN-Ceu-AS ont permis d'isoler un fragment et de le
10 sous cloner directement après traitement à la T4 DNA polymérase et phosphorylation par la polynucléotide kinase dans le vecteur commercial pMCS5 ouvert en bout franc en EcoRV. Ce fragment pLyso 5' contient les 2900 bp séquence en partie non publiée de la partie proximale du gène du lysozyme ainsi que l'équivalent des 18 premiers acides aminés de l'exon 1 correspondant au signal peptide du lysozyme. Ce fragment contient
15 donc un site donneur d'épissage ainsi que la séquence du petit intron artificiel, séquence ajoutée par l'oligonucléotide AS comme décrit précédemment avec le bras 5' du vecteur pOva5'.

Pour le bras 3' du vecteur pLysoRH, les amplifications distales avec les
20 oligonucléotides Lyso 2859 S et Lyso 3185 AS ont permis d'isoler un fragment de 2150 bp en 3' du gène. Ces oligonucléotides portent à leur extrémité des sites ScaI et MluI. Ce fragment soumis au traitement de la T4 DNA polymérase, d'une phosphorylation par la polynucléotide kinase et directement ligaturé dans le plasmide pMCS5 ouvert en bout franc par EcoRV donne le plasmide pLyso3'. L'hydrolyse de ce
25 plasmide par AflII/AvrII suivi de l'action de la T4 DNA polymérase et d'une ligature intramoléculaire permet de générer le plasmide pLyso3'.

5.3 Construction du squelette pOvaRH

L'assemblage final du vecteur de RH par apports successifs de différentes cassettes
30 (cassette de sélection, insertion du cDNA ou du gène d'intérêt...) est réalisé selon

différents schémas. Un schéma est décrit sans qu'il soit exclusif, d'autres possibilités existant en fonction des sites de restriction présents dans certains cDNAs d'intérêt.

Le plasmide pCMV NéoOva3' est construit par ligature du fragment Ova3' qui résulte de la purification après coupure par BamHI du plasmide pOva3', avec le fragment purifié et déphosphorylé pCMV Néo polyA, obtenu par hydrolyse BglII/BamHI du plasmide pCINeo(Δ -hindIII). Quelques modifications du polylinker présent en aval de l'insert Ova5'lyso sont également effectuées avant de rassembler les deux fragments Ova5'lyso et pCMV-Néo-Ova3' dans un vecteur pOvaRH (figure 3). Le fragment NarI/NotI présent dans pOvaLyso est remplacé par un adaptateur NotI pour donner pOvaLyso-NotI ce qui permet de conserver le site NotI comme site unique de clonage des cDNA d'intérêt en éliminant de nombreux sites. Le plasmide pOvaLyso-NotI est initialement coupé initialement par PacI, puis traité par la T4 DNA polymérase pour rendre l'ADN bout franc. La libération de l'insert OvaLyso-NotI est alors obtenue par une coupure NotI. Le fragment de 3kb OvaLyso PacI^F/ NotI est cloné aux sites KspI soumis à l'action de la T4 DNA polymérase afin de rendre les bouts francs / NotI de pCMV-Neo Ova3'. Ce clonage orienté permet de générer le vecteur de pOvaRH final qui présente de 5' en 3' :

- le site unique AscI, qui permet la linéarisation du vecteur avant transfection
- le bras génomique Ova5'lyso (1-18)-debut intron,
- le site unique NotI site unique de clonage des cDNA,
- la cassette de sélection à la néomycine
- le bras génomique Ova3'.

Le vecteur pOva RH est alors utilisable pour insérer les différents cDNAs d'intérêt.

5.4 Construction du squelette pLysoRH

Le fragment Lyso 3', obtenu par l'hydrolyse par MluI du plasmide pLyso3' est ligaturé dans le plasmide pLyso5', préalablement ouvert et déphosphorylé après hydrolyse par MluI. Il en résulte le plasmide pLyso5'Lyso3' dans lequel le fragment purifié et déphosphorylé pCMV Néo polyA, obtenu par hydrolyse NotI/MluI du plasmide intermédiaire pMCS5 CMVNéoPolyA. Ce dernier sous clonage est réalisé pour flanquer la cassette de sélection du site NotI en 5', afin de préserver ce site pour les clonages des

cDNAs d'intérêt. Il est obtenu par insertion du fragment BglII/BamHI du plasmide pCINeo(Δ -hindIII) dans le pMCS5 ouvert et déphosphorylé en EcoRV.

Le vecteur pLysoRH obtenu contient successivement de 5' en 3' :

- le site unique AscI, qui permet la linéarisation du vecteur avant transfection
- 5 - le bras génomique Lyso5' avec le peptide signal 1-18 -debut intron,
- le site unique NotI site unique de clonage des cDNA,
- la cassette de sélection à la néomycine
- le bras génomique Lyso3'.

Le vecteur pLysoRH est alors utilisable pour insérer les différents cDNAs d'intérêt
10 (Figure 4).

5.5 Application à l'expression de différentes protéines

Les cDNAs de différentes protéines d'intérêt ou protéines modèles sont insérés dans ces vecteurs pOvaRH et pLyso RH. De façon non exhaustive, la stratégie consiste à
15 préparer le cDNA selon le schéma présenté précédemment et à l'insérer dans le vecteur ouvert en NotI. Des variantes dans l'ordre des clonages des différentes parties peuvent être nécessaires. Des séquençages partiels ou en totalité sont réalisés afin de vérifier le bon enchaînement des différents éléments insérés. Ainsi, à titre d'exemples non exhaustifs, des vecteurs ont été construits avec les cDNAs de l'érythropoïétine pOvaRH
20 Epo, pLysoRH Epo, de la beta-galactosidase pOvaRH LacZ, pLysoRH LacZ, de l'héliomycine (peptide antibactérien pOvaRH Hélio, pLysoRH Hélio) La figure 5 illustre le pOvaRH LacZ.

Un cas particulier est l'application des vecteurs pOvaRH et pLyso RH à la production de molécules présentant leur propre signal peptide. La stratégie de construction utilisée
25 diffère un peu de celles précédemment décrites. Par exemple, le cDNA de l'interleukine 11 est un fragment nucléotidique de 1100 bp, sous cloné dans le vecteur pBS SK dans les sites EcoRI. Comme il n'est donc pas nécessaire de fusionner le cDNA d'intérêt avec le peptide signal du lysozyme, le cDNA est inséré directement en phase au niveau de l'ATG de l'ovalbumine, conduisant à une fusion au niveau du deuxième acide aminé
30 de l'interleukine 11. Dans cet exemple, le cDNA de l'IL-11 est soumis à l'action de la polymérase Taq dans une réaction de PCR en présence de deux oligonucléotides sens et

antisens qui présentent les sites Hind III et XbaI. Ce fragment est ainsi soumis à la double hydrolyse HindIII/XbaI et ligaturé dans le vecteur pMCS5, lui-même préparé ouvert en HindIII/XbaI, après double hydrolyse par ces enzymes et traitement de déphosphorylation à la CIAP. Il résulte de ce clonage directionnel le plasmide pMCS5-
5 Il-11. Ce dernier est soumis à la digestion HpaI/NsiI, le fragment est purifié et ligaturé dans le plasmide pOva5' AS, lui-même ouvert en NcoI/PstI, réparé en bout franc par l'action de la polymérase Klenow. Il en résulte le plasmide pOva5' IL-11.

Ce plasmide pOva5'IL-11 est soumis à la digestion par NotI, l'insert est purifié et ligaturé avec le plasmide pCMVNéoOva3', lui-même hydrolysé par NotI et
10 déphosphorylé. Il en résulte le plasmide pOvaRH IL-11 composé de :

- le site NotI (linéarisation du vecteur avant transfection)
- le bras génomique Ova5' avec l'ATG de l'ovalbumine,
- le cDNA de l'IL-11 fusionné sur l'ATG et comportant un polyA
- la cassette de sélection contenant le gène de résistance à la néomycine sous
15 la dépendance du promoteur CMV
- le bras génomique Ova3'

Une stratégie analogue permet d'obtenir le vecteur pLysoRH IL-11 en présence du peptide signal endogène lysozyme et par délétion du peptide signal de l'IL-11 et inversement par délétion du peptide signal lysozyme endogène et apport du peptide
20 signal de l'IL-11.

Exemple 6 : Transfection des vecteurs dans différentes cellules aviaires

6.1 Méthodes de transfections

25 Deux méthodes générales de transfections sont utilisées : l'électroporation et la transfection par des liposomes. Il semble que dans le système souris, l'électroporation soit en général choisi afin d'accroître l'efficacité de recombinaison des vecteurs de recombinaison homologe. Néanmoins, peu d'études comparatives ont été faites.

30 - l'électroporation

L'électroporation est une méthode qui permet de faire rentrer un DNA de taille très variable dans une cellule en créant par un choc électrique un pore transitoire au niveau

de la membrane cellulaire. Parmi les différents paramètres pouvant influencer l'efficacité de cette expérience, on peut citer la concentration cellulaire (de 1 à 10×10^6 cellules), la solution conductrice du signal contenant le mélange cellules DNA (PBS, milieu sans sérum ...), la concentration de DNA en général linéarisé (de 5 à 25 μg), la distance des électrodes (cuvettes ou électrodes simples directement dans la boîte ou le puits de culture), l'amplitude du signal dépendant de la capacitance (de 10 à 1000 μF) et du voltage appliqués (de 5 à 100mV pour les signaux carrés et de 200 à 350 V pour les signaux non carrés), le nombre de chocs électriques délivrés et la forme de ce(s) choc(s) électrique(s) appliqué(s). Par forme, on entend la façon dont une même charge électrique est délivrée, notamment selon un signal carré, non carré, exponentiel inverse...

Le tableau 5 illustre quelques-uns de ces paramètres :

Tableau 5 : Efficacité d'électroporation du plasmide pCINéo dans les cellules souches

Capacitance (μF)	25	150	300	500	700	1000
Clones A	5	122	226	335	408	286
Clones B	9	149	297	454	443	361
Clones C	10	180	218	361	402	365
Moyenne	8	150	247	383	418	337
Ecart Type	3	29	43	63	22	45

L'électroporation du plasmide pCINéo linéaire est réalisée à l'aide d'un électroporateur BioRad (Gene Pulser II). Les cellules souches dissociées, lavées dans un milieu sans sérum et ajustées à une concentration de 5×10^6 cellules dans 0,8 ml sont placées dans une cuvette d'électroporation (chambre de 4mm). 5 à 20 μg de plasmide linéarisé, préparé dans du TE sont ajoutés aux cellules et le mélange est laissé 5-10 min à température ambiante, puis le choc électrique est appliqué avec une capacitance fixée à 560 μF . Les cellules sont alors placées à 4°C environ 10 min, puisensemencées dans des boîtes de culture avec feeder dans les conditions de culture de ces cellules.

Classiquement, l'équivalent d'une cuvette soit 5×10^6 cellules sont réparties dans deux boîtes de 100 mm.

Le tableau présente 3 séries réalisées avec 15 µg de plasmide à 270 V. Les clones sont dénombrés après sélection à la néomycine pendant 7 jours (250 µg/ml), fixation au
5 méthanol et coloration au Wright/Giemsa

- les liposomes

- Par liposomes, on entend toute molécule chimique présentant entre autre des caractéristiques de cations lipidiques, seule ou associée à d'autres éléments

10 L'efficacité de différents liposomes a été comparée sur différents types cellulaires. Les cellules souches embryonnaires étant fragiles, la présence de sérum lors de la transfection est un élément important. Différents matériels commerciaux ont été testés. Il ressort que l'efficacité et la toxicité de ces composants sont variables (Pain et al., 1999). De plus, la présence de sérum permet de diminuer les effets relativement
15 toxiques de l'exposition des cellules aux lipofectants et ainsi de préserver les chances d'obtenir des cellules recombinantes dans un état physiologique et morphologique satisfaisant. Un avantage parmi d'autres de l'utilisation des liposomes est le faible nombre de cellules utilisées par essai. Le tableau 6 ci-dessous illustre une efficacité relative de transfection avec un vecteur simple d'expression :

20

Tableau 6 : Transfection des vecteurs de recombinaison dans différents types cellulaires

Les cellules sontensemencées dans leur milieu respectif à la densité de 5×10^5 à 10^6
25 cellules par boîte de 100mm pour chaque type cellulaire. Le mélange de transfection, pouvant varier de 10.5 µg liposomes/ 3.5 µg DNA à 15 µg liposomes/ 5 µg DNA par boîte de 100 mm, est mis sur les cellules de 3 à 15 heures selon les cas. La sélection à la néomycine est appliquée à 250 µg/ml et les clones apparaissent de 5 à 10 jours après transfection. Les clones sont prélevés et analysés par PCR afin de détecter les
30 évènements de recombinaison.

Un exemple typique d'amplification est constitué d'un clonage en puits d'une plaque de 24, d'un passage en puits d'une plaque de 12 puits, puis d'une amplification en boîte de 60 mm ou de 100 mm. Les étapes de criblage mises en place de façon optimale entre le passage du puits d'une plaque de 24 puits au puits d'une plaque de 12 puits permettent de limiter l'amplification aux seuls clones détectés positifs par PCR. Par puits de plaque de 6 puits, on obtient en général 5×10^5 à 10^6 cellules. Ainsi, ne sont congelés en viable que les clones criblés positifs par PCR. L'amplification pour analyse en Southern blot ne concerne également qu'un faible nombre de clones.

Le tableau rassemble différents exemples obtenus avec des cellules de différentes natures et à différents passages. Il est nécessaire de constater que les efficacités de transfection et d'efficacité de recombinaison semblent variables selon les vecteurs et pour un même vecteur pourraient être dépendantes de la physiologie (âge, état...) des cellules utilisées.

Cellules (nb de passage)	Vecteurs	Clones analysés	Clones positifs par PCR	
			nb	%
LMH (p25)	pOvaRH Hélio	35	1	3,8
HD11	pLysoRH GFP	40	1	2,5
HD11	pLysoRH Epo	36	3	8,3
Valo4 (p39)	pOvaRH Hélio	64	1	1,6
Valo4 (p53)	pOvaRH LacZ	28	1	3,6
S86N 48 (p13)	pOvaRH Hélio	48	1	2,1
S86N 16 (p123)	pOvaRH Hélio	264	23	8,7
S86N 16 (p129)	pOvaRH LacZ	168	1	0,6
S86N 16 (p129)	pOvaRH hélio	157	14	8,9
S86N 16 (p137)	pOvaRH Hélio	96	3	3,1
S86N 16 (p140)	pOvaRH LacZ	143	7	4,9
S86N 16 (p203)	pLysoRHx	94	25	26
S86N 45 (p71)	pLysoRHx	94	10	10,4
S86N 45 (p79)	pLysoRH Hélio	96	15	15,6

S86N 88 (p14°)	pOvaRH LacZ	79	1	1.2
Valo8 (p10)	pOvaRH Hélio	35	1	2.8
Valo8 (p 13)	pOvaRH Hélio	120	3	2.5

6.2 Efficacité de transfection stable avec les vecteurs de recombinaison

L'efficacité de transfection stable est estimée par le nombre de clones obtenus après sélection par la drogue qui est détoxifiée par le gène présent dans la cassette de sélection. Dans les cas reportés, la néomycine a été généralement utilisée. D'autres drogues peuvent être utilisées en fonction de la présence d'un gène de résistance différent dans le vecteur transfecté. Parmi les drogues classiques, on trouve la néomycine, l'hygromycine, la puromycine, la phléomycine, la zéomycine, la blasticidine, la viomycine.... D'autres milieux de sélection peuvent être utilisés comme l'addition d'analogues des bases, les milieux de sélection classique comme le milieu HAT...

Les clones sont comptés en fin de période de sélection correspondant à la disparition des cellules dans les boîtes témoins de l'expérience. Ces témoins sont soit des cellules non transfectées soit des cellules transfectées avec un vecteur ne contenant pas de gène de résistance à l'antibiotique utilisé.

6.3 Cellules utilisées

6.3.1 Fibroblastes embryonnaires de poulet (CEFs)

Les fibroblastes Embryonnaires de poulet (Chicken Embryonic Fibroblasts) sont obtenus à partir d'une mise en culture d'embryons de poulet incubés de 9 à 13 jours selon un protocole bien établi et connu de la personne de l'art. Ces cellules primaires sont amplifiées et maintenues en culture pendant un nombre de passage peu important (inférieur à 30 en général) car les cellules présentent rapidement (en général à partir des passages 15 à 20) une phase progressive d'arrêt de prolifération et une entrée en sénescence caractérisée par un taux de divisions plus faible, une morphologie étalée de moins en moins fibroblastique. Cette phase de sénescence conduit à la disparition des cellules sauf dans de très rares cas où l'établissement spontané de cellules

fibroblastiques aviaires et de poulet en particulier a été observé (lignée DF-1) (Himly et al., 1998 ; Kim et al., 2001).

Les transfections des vecteurs de recombinaison homologue sont donc réalisées lors des passages précoces (de 1 à 10), afin d'optimiser à la fois la possibilité de sélectionner et
5 d'amplifier les clones résistants à la sélection mais aussi pour limiter une éventuelle dérive caryotypique et l'entrée rapide en sénescence. En général, les clones obtenus sont isolables, mais pas ou peu amplifiables. Par contre, ils peuvent être considérés comme des sources potentielles de noyaux modifiés pour des expériences de clonage nucléaire.

10 6.3.2 Lignée LMH

La lignée de cellules LMH est une lignée d'hépatocyte de poulet, obtenue par carcinogénèse chimique (Kawaguchi et al., 1987) Cette lignée a été caractérisée au niveau caryotypique et présente un polyploïdie importante. Les cellules sont en général maintenues en DMEM ou HamF12, en présence de 8 % de sérum de veau fœtal, de 2%
15 de sérum de poulet, de 10% de TPB et d'antibiotiques. Ces cellules représentent un type cellulaire dendritique intéressant, très différent des cellules monocytes, fibroblastes et des cellules souches et présentent une sensibilité relative à différentes hormones stéroïdiennes. Les transfections de vecteurs de recombinaison pOvaRH notamment dans ces cellules ont permis d'obtenir des clones et des événements de recombinaison. Le
20 tableau 6 illustre les résultats de ces transfections.

6.3.3 Lignée HD11

La lignée de cellule HD11 est une lignée de monocytes de poulet immortalisés par la présence de l'oncogène v-myc apportée par un rétrovirus aviaire (Beug, et al., 1979).
25 Cette lignée est productrice de virus, capables de propager l'oncogène. Certains clones pourraient être éventuellement non producteurs. Les cellules sont en général maintenues en milieu HamF12, complémenté avec 5% de sérum de veau fœtal, de 2% de sérum de poulet, de 10% TPB. Comme précisé dans l'introduction, les macrophages activés produisent des quantités de lysozyme endogène. En les modifiant par les vecteurs de
30 recombinaison pLysoRH, ces cellules peuvent donc servir de modèle de production à la

molécule insérée dans ce vecteur. On réalise ainsi une stratégie knock in de production. Le tableau 6 illustre ci-dessus les résultats de ces transfections.

6.3.4 Cellules souches embryonnaires

- 5 Les cellules souches embryonnaires de poulet utilisées dans les exemples sont des cellules souches obtenues in vitro par la mise en culture de cellules de blastodermes de poulet (Pain et al., 1996 ; US 6,114,168 ; WO 96/12793). Les cellules sont maintenues, amplifiées in vitro et sont surtout capables de proliférer sur des périodes de temps long. Les profils de prolifération mettent en évidence des phases de prolifération rapide et
- 10 plus lente au cours de l'établissement relatif des cellules. Cette particularité d'établissement à partir d'un isolat primaire est tout à fait unique pour une cellule d'origine aviaire, sans l'intervention extérieure d'un agent immortalisant ou un processus de transformation chimique. On peut distinguer ainsi arbitrairement les phases de prolifération précoces de ces cellules, qui sont observées durant les premiers
- 15 passages (du passage 1 au passage 20) et les phases de prolifération plus tardives (passages > 20). Ces cellules souches sont transfectées avec les différents vecteurs de recombinaison contenant les cDNAs d'intérêt.

Le tableau 6 et le tableau 7 ci-dessus illustrent les résultats obtenus avec différents

20 vecteurs. Il apparaît que ces cellules souches sont modifiables dans différents loci par une approche de recombinaison homologue.

Tableau 7 : Transfection de cellules CECs avec différents vecteurs d'expression simple

- 25 5 µg de vecteur pCINéo avec 15 µg de Fugène 6 (Roche) est transfecté sous sa forme circulaire sur $0,8 \times 10^6$ cellules S86N16 à différents passages. Après application de la sélection à la néomycine par addition de G418 (250ug/ml) pendant 5 à 8 jours, des clones sont obtenus. Les boîtes sont fixées au méthanol (100%) et une coloration au Giemsa permet de dénombrer rapidement les clones. Cet exemple démontre dans des
- 30 essais indépendants que les cellules sont transfectables en stable avec des vecteurs simples, sélectionnables et que les clones peuvent être amplifiés. Néanmoins, les

niveaux d'expression des transgènes sont très variables d'un clone à l'autre, comme on peut le visualiser facilement en évaluant l'intensité de fluorescence du marqueur E-GFP par exemple.

Essais	1	2	3	4	5	6	Moyenne	Ecart type
Nombre de clones	75	90	135	124	146	106	113	27

5

6.4 Etat physiologique des cellules

Par état physiologique, on entend l'état de différenciation, de transcription et d'activation des cellules utilisées. Modifiées au niveau des loci ciblés par les vecteurs
10 simples et les vecteurs de recombinaison homologue, les cellules réagissent au niveau physiologique. Il apparaît donc utile de les suivre en fonction de leur utilisation future dont les deux principales sont :

- l'injection des cellules modifiées dans des embryons receveurs pour suivre leur contribution dans les embryons et plus tard au niveau des poussins et animaux adultes
- 15 - la production in vitro par les cellules modifiées des molécules d'intérêt apportées dans les vecteurs notamment mais de façon non exclusive dans le cas des cellules LMH et HD11.

6.5 Clonage et détection des événements de recombinaison

20

6.5.1 Clonage

Les clones, observés macroscopiquement et microscopiquement sont prélevés et mis directement en plaque de 24 puits. Il est important de prélever les clones dès que possible pour limiter les effets de mélange entre clones. L'origine des clones selon les
25 différentes boîtes est mentionnée pour contrôler le niveau d'indépendance de deux clones positifs par exemple. Les conditions de prolifération des clones sont à peu près les mêmes que celles utilisées pour les cellules parentales. Les clones, une fois prélevés

sont observés quotidiennement et dès que la densité des cellules le permet, les clones sont dissociés et amplifiés pour analyse.

6.5.2 Criblage des clones par PCR

- 5 Les cellules des clones en prolifération dans les puits sont lavées, dissociées et préparées pour être d'une part réensemencées pour une amplification et d'autre part pour être analysées. Le DNA est principalement extrait à l'aide de techniques classiques dont des kits commerciaux. Différentes détectations sont lancées pour cribler les événements de recombinaison. Les mises au point des conditions de PCR sont réalisées
- 10 pour chaque couple d'oligonucléotides avec du DNA extrait de cellules transfectées, sélectionnées et non clonées individuellement. Cette approche en 'pool' permet d'obtenir rapidement du matériel à tester. De façon générale, une première PCR est réalisée pour détecter le locus endogène ciblé afin de s'assurer de la qualité des extractions et des DNA. Une deuxième PCR est réalisée pour détecter un événement de
- 15 recombinaison entre un oligonucléotide externe à la construction et une séquence commune à tous les vecteurs d'une même famille par exemple la séquence peptide signal lyso 1-18. Cette PCR est considérée comme discriminante pour les événements de recombinaison. Sur les clones positifs dans cette dernière PCR, de nouvelles séries de PCR sont réalisées toujours avec le même oligonucléotide externe mais avec un autre
- 20 oligonucléotide spécifique de chaque cDNA de façon à s'assurer de sa présence et de la non modification générale du cDNA inséré. Cette PCR est considérée comme discriminante et permet de renforcer l'observation des clones positifs.

La figure 6 illustre cette détection par PCR de clones. La majorité des clones est détectée négative, certains détectés positifs recombinés. Ce premier tri permet de ne

25 garder que quelques clones qui sont amplifiés, congelés et analysés par Southern blot.

Légendes figure 6 : Détection par PCR des clones positifs recombinants

- A titre d'exemple le DNA est extrait avec le kit Promega (Madison, WS). Le culot cellulaire de chaque clone est repris dans 300 µl de tampon de lyse (Nuclei Lysis
- 30 Solution, NLS), en présence de 20 µg/ml de RNase. Le lysat est homogénéisé, incubé 30 min à 37°C et 100 µl de tampon de précipitation de Protéines (Protein Precipitation

- solution PPS) ajouté. L'ensemble est incubé à 4°C après agitation forte. Le surnageant est prélevé après centrifugation et 400 µl d'isopropanol ajouté. Après précipitation et centrifugation, le culot est lavé en éthanol 70°C, séché et repris dans 50 µl de TE (10.1). Les volumes peuvent être utilisés de façon proportionnelle pour des extractions avec
- 5 plus de cellules. La quantité de DNA obtenue est estimée par dosage spectrophotométrique. L'extraction d'un culot équivalent à un puits d'une plaque de 24 puits donne approximativement de 0,5 à 2 µg de DNA selon la densité des cellules dans le puits. Les PCR sont réalisées sur 100 à 500 ng environ.
- 10 - Une première PCR est réalisée sur 38 échantillons (N° 1 à 39) pour détecter le locus ovalbumine endogène et s'assurer de la qualité des extractions et des DNA. Cette réaction utilise deux oligonucléotides qui donne une bande amplifiée de taille de 2950 bp (pistes 1 à 39 partie supérieure du gel).
- Une deuxième PCR est réalisée pour détecter un événement de recombinaison entre un
- 15 oligonucléotide externe et la séquence commune à tous les vecteurs ici, la séquence peptide signal lyso 1-18. La taille attendue dans ce cas est de 2900 bp (pistes 1 à 39, partie inférieure du gel).
- M : marqueur de taille,
 - C, contrôle DNA (obtenu d'un mélange de clones),
 - 20 - Cn, contrôle négatif de la PCR sans DNA

Une autre PCR est réalisée pour déterminer par exclusion le sexe des clones positifs avec des oligonucléotides spécifiques d'une région répétée du chromosome W. Seuls les clones Femelles (ZW) pourront être détectés, les clones males (ZZ) ne le seront pas.

- 25 **La figure 7** illustre cette détection différentielle sur quelques clones.

Légende de la Figure 7 : Détection du sexe de différents clones identifiés positifs par PCR

- Les DNA de différents clones détectés positifs par PCR pour un événement de
- 30 recombinaison homologue sont soumis à une PCR génomique pour déterminer le sexe des clones. Les oligonucléotides utilisés sont spécifiques du chromosome W du poulet.

Ils ne peuvent détecter que les clones femelles. Dans la figure, les clones sont majoritairement males, comme les cellules utilisées (S86N16), à l'exception du clone A5-1, issu de cellules précoces d'une autre origine (cellules S86N 48).

- 5 Clones obtenus avec pOvaRH Hélio : C10, D21, C44, A5, A21, A5-1
 Clones obtenus avec pOvaRH lacZ : A 5-2, A25, A28, B28, B36
 Cellules parentales : S86N 16
 Control positif : DNA de sang de femelle
 Control négatif : DNA de sang de male
- 10 M : Marker

6.5.3 Southern blot

- Afin de vérifier les résultats obtenus en PCR génomiques sur les clones positifs avec les deux PCR discriminantes pour la détection d'un événement de recombinaison, une analyse en Southern blot est réalisée avec du DNA extrait des clones. Cette analyse permet de vérifier que :

les tailles du locus ciblé sont conservées et qu'il n'y a pas de délétion majeure
 un seul événement de recombinaison a eu lieu et que le génome ne contient pas d'autres intégrations aléatoires.

- 20 Le DNA des clones est extrait selon une méthode classique de Protéinase K-SDS, avec extraction phénolique ou à l'aide d'un kit commercial d'extraction (Qiagen, Promega). Dans une approche classique de biologie moléculaire, une quantité variable de DNA est soumise à l'hydrolyse par différentes enzymes, afin de permettre de repérer les fragments dont la taille est différente en fonction de l'événement de recombinaison.
- 25 Le Tableau 8 illustre la détection des événements de recombinaison par Southern Blot en fonction des différentes sondes utilisées

Tableau 8 : Détection des événements de recombinaison par Southern blot

- Les DNA hydrolysés sont soumis à une migration électrophorétique qui sépare les fragments selon leur taille. Le procédé classique de Southern blot est appliqué, avec un transfert sur une membrane hybond N+ (Amersham Pharmacia biotech, UK). Les sondes utilisées pour l'hybridation sont obtenues soit par PCR, soit par purification d'un
- 5 fragment plasmidique contenant les différents gènes d'intérêt. A titre d'exemple, les sondes lacZ (1159 bp) et Néo (354 bp) sont obtenues par PCR à partir de matrice plasmidique. La sonde ovalbumine 3' est une sonde intronique de 800 bp, obtenue à partir du DNA génomique. La sonde ovalbumine 5' est une sonde intronique de 870 bp. Ces sondes sont obtenues par PCR.
- 10 Les sondes purifiées sont marquées avec l'alcaline phosphatase à l'aide du kit AlkPhos (Amersham Pharmacia Biotech, UK) et peuvent être gardées plusieurs mois à -20°C. Pour la détection les membranes sont pré hybridées sous agitation à raison de 1 ml/cm² dans un tampon d'hybridation et ensuite hybridées à 55°C par addition de la sonde marquée (5 ng/ml). Les membranes sont alors lavées à 65°C dans le tampon primaire
- 15 contenant de l'urée 2M, du NaCl 150 mM, du NaPhosphate 50mM, du MgCl₂ 1 mM, SDS 0,1% et du 'blocking agent' 0,2%, fourni par le kit, puis dans le tampon secondaire contenant TrisHCl 50 mM pH 10.0, NaCl 100 mM à température ambiante.
- Le système de révélation par chimiluminescence, prêt à l'emploi est ajouté sur la membrane lavée (1 ml/cm²) et l'intensité des bandes est révélée par autoradiographie.
- 20 La taille des bandes détectées est comparée avec la taille attendue.
- Le critère pour retenir les clones est une bonne adéquation entre la taille attendue et celle observée. Des hybridations complémentaires sont réalisées (résultat non montré)

Digestion	BamH I		ScaI	
Sonde	- RH	RH Hélio	- RH	RH Hélio
Ovalbumine 3'	18.5 kb	7 kb	12 kb	12.7 kb
Ovalbumine 5'	18.5	9.5	12	12.7
Néomycine	/	2	/	12

- 25 La figure 8 illustre cette analyse en fonction des tailles attendues.

6.6 Caractérisation des clones

Les différents critères utilisés pour caractériser les cellules parentales sont utilisés pour caractériser les cellules clonées.

5 6.6.1 Vérification du caryotype

Le caryotype des cellules est analysé sur les métaphases des cellules obtenues selon un protocole classique après un traitement à la colcémide (pulse de quelques heures avec 0,05 à 0,15 µg/ml final, de préférence 0,08 µg/ml) des cellules en prolifération. Les métaphases étalées sont observées sous microscope et le nombre de macrochromosomes
10 compté. Le comptage des minichromosomes est réalisable mais plus délicat et une évaluation plus en détail par hybridation in situ peut également être envisagée. Par ailleurs, la vérification par FISH (hybridation in situ avec une sonde fluorescente) de la présence du transgène renforce les observations réalisées par Southern blot quant à l'unicité de l'événement.

15

6.6.2 Activité Alcaline phosphatase endogène

Le premier test immunocytochimique utilisé est la détection de l'activité alcaline phosphatase endogène. Tous les clones positifs en PCR et validés par l'analyse en Southern Blot sont étudiés comparativement aux cellules parentales.

20

6.6.3 Anticorps de surface

Comme les cellules parentales sont positives, la présence des antigènes de surface spécifiques des cellules souches est également recherchée au niveau des clones recombinés obtenus. Les réactions avec les anticorps SSEA-1, TEC-01 et EMA-1 sont
25 systématiquement réalisées.

6.6.4 Activité télomérase

L'activité télomérase apparaît être un des bons critères pour juger de l'état indifférencié de cellules souches. Aussi, comme pour les cellules parentales, l'activité télomérase des
30 différents clones recombinés est analysée. Lors du passage des clones pour leur amplification et congélation, un petit aliquot de 5×10^3 à 5×10^5 cellules est préparé

sous forme de culot cellulaire et l'activité télomérase de ces cellules est évaluée à l'aide du kit 'Telo TAGGGTélomerase PCR Elisa' (Roche). Le niveau de l'activité télomérase apparaît être un bon reflet de la qualité des clones notamment après la pression de sélection appliquée par la drogue.

5

Le tableau 9 ci-dessous illustre quelques-unes de ces caractéristiques sur des clones recombinés :

Tableau 9 : Caractérisation de clones pOvaRH Hélio issus du criblage par PCR

10

Cellules	Détection AP*		Anticorps TEC01 (%)		Anticorps EMA-1 (%)		Télomérase (blanc= 0,07)	
	- RA	+ RA	- RA	+ RA	- RA	+ RA	- RA	+ RA
S86N16 *	++++	-	90	<10	90	10	> 1,5	<0,2
C10	+++	-	70	<10	90	<10	1,23	0,282
C44	+++	-	70	<10	90	<10	1,13	0,20
D21	+++	-	90	<10	90	<10	1,04	0,15
A5-1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1,08	0,257
A21	+++	+	NT	NT	NT	NT	1,13	0,62
A 37	+++	+/-	NT	NT	NT	NT	1,09	0,566

Les cellules sontensemencées dans des puits d'une plaque de 12 puits à 10^4 cellules par puit en moyenne. Les différentes caractérisations sont effectuées après fixation dans le cas de la détection AP et anticorps et sur culot sec qui est lysé selon le protocole établi dans le kit Roche dans le cas de l'activité télomérase (NT = Non Testé).

15

Conclusion : les clones sont dans leur ensemble semblables aux cellules parentales *(S86N16) quant aux différents marqueurs utilisés pour caractériser l'état des cellules.

6.7 Conversion allélique

20 Les clones obtenus et sélectionnés après l'analyse en PCR et en Southern blot sont a priori modifiés sur un seul allèle (détection de l'allèle sauvage en analyse Southern Blot). L'obtention des deux allèles modifiés peut se réaliser in vivo et in vitro. In vivo, les animaux homozygotes pour la modification sont obtenus après croisement des animaux hétérozygotes, eux mêmes descendants des animaux chimères, directement

obtenus après injection des cellules modifiées. In vitro, la conversion allélique du deuxième allèle non encore modifié est notamment possible par l'application sur les clones d'une sélection à de fortes doses de la drogue G418 (de 0,5 à 5 mg/ml). Cette approche permet d'obtenir des quantités intéressantes de protéines à la fois in vitro et in vivo.

Exemple 7 : Test in vitro des vecteurs de recombinaison pour la production des protéines d'intérêt.

Le but de l'invention est de produire les molécules dans le liquide physiologique de l'animal, notamment le sang et le blanc d'œuf. Pour réaliser cette approche les vecteurs, notamment les vecteurs de recombinaison homologue sont construits selon les schémas décrits précédemment. Ces vecteurs de recombinaison ciblent différents loci dont principalement le locus de l'ovalbumine et celui du lysozyme. Un point important est la validation de ces vecteurs par une approche in vitro. Notamment il est important de suivre le repliement de la protéine à produire, les modifications post traductionnelles obtenues in vitro dans un système aviaire et l'influence de l'état homozygote du locus modifié sur l'expression de la molécule d'intérêt. Les stratégies de sécrétion sont également étudiées via un modèle in vitro, avec des signaux peptides et des stratégies d'épissage différents selon les constructions.

Deux systèmes complémentaires sont développés pour étudier chacune des principales classes de vecteurs.

7.1 Différenciation in vitro des clones recombinés

Dans une première approche la différenciation in vitro des clones de cellules souches peut être mise à profit pour suivre la production des molécules dans le surnageant des cultures. Les conditions de milieux utilisés font appel à la formation de corps embryoides soumis à la présence de différents agents tels que des inducteurs comme par exemple le diméthylsulfoxyde, l'acide rétinoïque, le TPA, le PMA, le LPS, des facteurs comme par exemple le FGF, TGF β , MCSF, cMGF, des hormones, comme les hormones

stéroïdes, l'oestradiol, la dexaméthasone, la progestérone ou d'autres familles d'hormones.

7.2 Stimulation des cellules en lignée recombinées

5

7.2.1 Validation des vecteurs pOvaRH

Les cellules LMH sont des cellules aviaires issues d'une tumeur hépatique. D'après quelques exemples pris dans la littérature, le gène de l'ovalbumine semble être activable dans la lignée LMH selon différentes conditions de stimulations hormonales.

10 Notamment, une combinatoire d'insuline, d'oestradiol et de dexaméthasone (stéroïde mimant l'action des glucocorticoïdes) permet une induction plus ou moins importante du gène de l'ovalbumine. Cette stimulation peut être utilisée sur les clones recombinés des cellules LMH. Des co-transfections des récepteurs nucléaires ER et COUTF sont également envisagées pour accroître le niveau de ces récepteurs dans les cellules et ainsi
15 permettre une meilleure induction du gène de l'ovalbumine sous l'effet des différents inducteurs utilisés. Les vecteurs de la famille pOvaRH sont préférentiellement utilisés dans cette approche.

7.2.2 Validation des vecteurs pLyso RH

20 Il apparaît possible d'induire la différenciation des cellules HD11, lignée de monocytes de poulet en cellules macrophages par différents traitements, dont une action par les lipopolysaccharides (Goethe et al., 1994 ; Goethe and Phi-Van, 1998). Dans une approche de stimulation par ces substances, le surnageant des clones recombinés, notamment avec les vecteurs de la famille pLysoRH est étudié et permet d'obtenir des
25 quantités importantes de protéines d'intérêt.

Le Tableau 10 ci-dessous illustre cette production de molécules d'intérêt à partir des cellules HD11 recombinées avec un des vecteurs de la famille pLysoRH spécifiquement sous l'action d'inducteur dont les LPS.

30 **Tableau 10 : Stimulation des cellules HD11 transfectées avec le vecteur pLyso RH**
Epo

Les cellules HD11 sont transfectées et des clones recombinés obtenus avec le vecteur pLysoRH Epo. Sur les clones stimulés par le LPS (5 µg/ml), deux analyses sont effectuées :

5 A : une réaction de RT-PCR pour détecter les messagers du lysozyme endogène dans les cellules non transfectées induites et les messagers de l'érythropoïétine dans les clones de cellules recombinées.

B : Une détection par réaction Elisa (kit Roche) du surnageant des clones stimulés ou non stimulés permet de titrer la présence d'érythropoïétine

		D.O. à 450	Concentration
Standard	S1	0	0
	S2	0,12	11
	S3	0,26	20
	S4	0,46	41
	S5	0,86	86
	S6	2,00	179
Contrôle positif		0,79	71,4
Contrôle négatif		0,09	1,2
HD11 parentales	- LPS	0	< 0,5
Clones non recombinés	+ LPS	0	< 0,5
Clone 1 pLysoRH Epo	- LPS	0,67	61,3
	+ LPS	2,22	199

Conclusion : le clone 1 produit de grandes quantités d'érythropoïétine dans le surnageant de culture.

10

Exemple 8 : Injection des cellules modifiées dans des embryons receveurs et obtention d'animaux.

Les clones de cellules souches modifiées sont caractérisés comme les cellules parentales à l'aide des différents marqueurs d'immunocytochimie décrits précédemment. A l'issue de ces contrôles, certains clones sont utilisés pour générer des animaux modifiés, destinés à produire la molécule d'intérêt. Parmi les différentes stratégies utilisées pour produire ces animaux, on peut distinguer :

15

20 8.1 Injection intrablastodermique.

Les cellules modifiées sont injectées dans la cavité blastodermique d'un embryon receveur de stade blastula selon un protocole décrit précédemment (Pain et al., 1996 . Brevets US 6,114,168 ; WO 96/12793). Les embryons utilisés dans cette approche sont

non incubés ou juste incubés. Les cellules vont participer à la colonisation des embryons. Différentes méthodes complémentaires permettent d'évaluer le niveau de contribution des cellules injectées, par exemple, une méthode est basée sur une différence phénotypique entre une souche receveur non pigmentée blanche et une souche donneur colorée (dont sont issues les cellules utilisées). Une autre méthode est le suivi de la présence du transgène par PCR génomique à l'aide d'oligonucléotides spécifiques.

La figure 9 illustre la contribution phénotypique d'un clone modifié avec un vecteur d'expression simple.

10

Légende de la figure 9 : Obtention de chimères avec les clones modifiés

Chimères obtenues avec des cellules modifiées par le vecteur simple pEGFP- SV40 Néo
Les œufs injectés par voie blastodermique sont ouverts à différents stades et les embryons prélevés pour être analysés. Le DNA extrait est soumis à une réaction de PCR génomique avec différents oligonucléotides pour détecter la présence du transgène (ici la E-GFP). La partie supérieure du gel montre ainsi 21 échantillons analysés dont 11 détectés positifs sur les 15 embryons injectés analysés. La partie inférieure montre l'analyse réalisée avec une autre paire d'oligonucléotides, permettant de valider la qualité du DNA et de l'extraction.

Conclusion : les cellules embryonnaires modifiées par un vecteur d'expression simple peuvent contribuer et coloniser les embryons de façon efficace.

Le tableau 11 ci-dessous illustre l'obtention de chimères avec un clone recombiné.

Tableau 11 : Différentes chimères phénotypiques obtenues avec un clone recombiné par le vecteur pOvarH Hélios, injecté par voie intra-blastodermique. Le taux apparent de chimérisme est variable.

Cellules injectées	Vecteur	Animaux vivants	Chimères (%)
S86N 66 (p5)*	x	13	1 (8 %)

S86N 48 clone A5	pOvaRH Hélio	37	1 (3%)
S86N 48 clone A5	pOvaRH hélio	43	3 (7%)**

* Cellules non modifiées en contrôle

** 6 autres animaux chimériques ont été obtenus à l'état embryonnaire

- 5 Le DNA des animaux chimères vivants a été extrait à partir d'une biopsie de plume et une détection PCR confirme la présence du transgène dans les échantillons (résultat non montré).

8.2 Injection intracardiaque

- 10 Les cellules modifiées sont injectées dans la circulation sanguine via la voie intracardiaque d'un embryon de 48 à 72 h d'incubation. A ce stade de développement, la morphogénèse de l'embryon permet une accessibilité importante de la cavité cardiaque en formation. A l'aide de fins capillaires les cellules sont injectées directement. Le développement se poursuit normalement jusqu'à l'éclosion.
- 15 Le Tableau 12 ci-dessous illustre la contribution phénotypique de clones modifiés dans les tissus d'embryons par injection intracardiaque

Tableau 12 : Obtention de chimères phénotypiques par injection intracardiaque

- 20 Les cellules d'un clone modifié avec un vecteur simple (dans l'exemple le clone 14A est obtenu avec le vecteur pVVS65 contenant le pCMV E-GFP SV40 Néo) ou un vecteur de recombinaison sont injectées en intracardiaque directement dans la circulation d'un embryon incubé quelques heures (de 36 à 72 heures). Dans l'exemple les tissus sont prélevés sur les embryons de 5 à 21 jours selon les cas. Une PCR génomique permet de
- 25 détecter la présence du transgène, tandis qu'une autre PCR sur un gène endogène valide la qualité du DNA analysé.

Cellules	Embryons injectés	Embryons analysés	Embryons positifs	%
Exp 1	40	16	2	12,5

Exp 2	40	18	3	16,7
Exp3 *	50	14	2	14,3
Exp4*	50	18	2	11,1
Exp5*	50	22	1	4,5

* différents tissus sont prélevés sur des poussins à l'éclosion et analysés. Les détections PCR sont positives en général sur plusieurs tissus différents.

5 8.3 Utilisation des noyaux modifiés comme source de noyaux dans un processus de transfert nucléaire.

Les cellules modifiées sont des sources de noyaux modifiés qui peuvent être utilisés dans des techniques de transfert nucléaire dans un ovocyte receveur afin de reconstituer un embryon. Dans ce cas, la modification apportée par le noyau est directement portée par l'animal dans son patrimoine génétique et donc transmis à tous ses descendants. Les techniques actuelles de fusion de la cellule et /ou du seul noyau avec l'ovocyte préparé permettent d'envisager une telle approche. Les phases d'activation permettant alors une reprogrammation efficace du noyau donneur en lieu et place du matériel génétique haploïde de l'ovocyte receveur.

15

REFERENCES

Ahne, B. and W. H. Stratling (1994). Characterization of a myeloid-specific enhancer of the chicken lysozyme gene. Major role for an Ets transcription factor-binding site. J Biol Chem 269 : 17794-17801.

Altschmied, J., M. Muller, et al. (1989). Cooperative interaction of chicken lysozyme enhancer sub-domains partially overlapping with a steroid receptor binding site. Nucleic Acids Res 17 : 4975-4991.

Arao, Y., E. Yamamoto, et al. (1996a). Steroid hormone-induced expression of the chicken ovalbumin gene and the levels of nuclear steroid hormone receptors in chick oviduct. Biosci Biotechnol Biochem 60 : 493-495.

25

- Arao, Y., N. Miyatake, et al. (1996b). Steroid hormones differentially induce transcription of the chicken ovalbumin gene, but stabilize the mRNA with the same half-life. *J. Biochem* 120 : 710-715.
- Arnold, R., M. Burcin, et al. (1996). DNA bending by the silencer protein NeP1 is
5 modulated by TR and RXR. *Nucleic Acids Res* 24 : 2640-2647.
- Baba TW et al. (1988). Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144: 139-151.
- Baldacci, P., A. Royal, et al. (1981). DNA organisation in the chicken lysozyme gene region. *Nucleic Acids Res* 9 : 3575-3588.
- 10 Baniahmad, A., C. Steiner, et al. (1990). Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61: 505-514.
- Baniahmad, A., M. Muller, et al. (1987). Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. *Embo J.* 6 :
15 2297-2303.
- Bell, D. W., D. C. Wahrer, et al. (1999). Common nonsense mutations in RAD52. *Cancer Res* 59 : 3883-3888.
- Bellard, M., G. Dretzen, et al. (1982). Disruption of the typical chromatin structure in a 2500 base-pair region at the 5' end of the actively transcribed ovalbumin gene. *Embo J* 1
20 : 223-230.
- Bellard, M., G. Dretzen, et al. (1986). Hormonally induced alterations of chromatin structure in the polyadenylation and transcription termination regions of the chicken ovalbumin gene. *Embo J* 5 : 567-574.
- Berinstein, N., N. Pennell, et al. (1992). Gene replacement with one-sided homologous
25 recombination. *Mol Cell Biol* 12 : 360-367.

- Beug H, von Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T. (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 18 : 375-390.
- 5 Bezzubova, O. Y. and J. M. Buerstedde (1994). Gene conversion in the chicken immunoglobulin locus: a paradigm of homologous recombination in higher eukaryotes. *Experientia* 50 : 270-276.
- Bezzubova, O., A. Shinohara, et al. (1993). A chicken RAD51 homologue is expressed at high levels in lymphoid and reproductive organs. *Nucleic Acids Res* 21 : 1577-1580.
- 10 Bezzubova, O., A. Silbergleit, et al. (1997). Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54^{-/-} mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell* 89 : 185-193.
- Bhat, M. K., K. Ashizawa, et al. (1994). Phosphorylation enhances the target gene sequence-dependent dimerization of thyroid hormone receptor with retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 7927-7931.
- 15 Bibikova, M., D. Carroll, et al. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 21 : 289-297.
- Bonifer, C., U. Jagle, et al. (1997). The chicken lysozyme locus as a paradigm for the complex developmental regulation of eukaryotic gene loci. *J Biol Chem* 272 : 26075-26078.
- 20 Brenneman, M., F. S. Gimble, et al. (1996). Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in human cells by electroporation with site-specific endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 3608-3612.
- Buerstedde JM and Takeda S. (1991). Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67: 179-188.
- 25 Buerstedde JM et al. (1990). Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *Embo J* 9 : 921-927.

- Burcin, M., R. Arnold, et al. (1997). Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol Cell Biol* 17 : 1281-1288.
- Ciejek, E. M., M. J. Tsai, et al. (1983). Actively transcribed genes are associated with
5 the nuclear matrix. *Nature* 306 : 607-609.
- Cochet, M., F. Perrin, et al. (1979). Cloning of an almost full-length chicken conalbumin double-stranded cDNA. *Nucleic Acids Res* 6 : 2435-2452.
- Cohen-Tannoudji, M., S. Robine, et al. (1998). I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 18 : 1444-1448.
- 10 Darling, D. S., R. L. Carter, et al. (1993). Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J Biol Chem* 268 : 10221-10227.
- Dean, D. C., B. J. Knoll, et al. (1983). A 5'-flanking sequence essential for progesterone regulation of an ovalbumin fusion gene. *Nature* 305 : 551-554.
- Dean, D. C., R. Gope, et al. (1984). A similar 5'-flanking region is required for estrogen
15 and progesterone induction of ovalbumin gene expression. *J Biol Chem* 259 : 9967-9970.
- Dean, D. M., P. S. Jones, et al. (1996). Regulation of the chicken ovalbumin gene by estrogen and corticosterone requires a novel DNA element that binds a labile protein, Chirp-1. *Mol Cell Biol* 16 : 2015-2024.
- 20 Dean, D. M., R. R. Berger, et al. (1998). A winged-helix family member is involved in a steroid hormone-triggered regulatory circuit. *Endocrinology* 139 : 4967-4975.
- Dean, D.M., Jones, P.S. et al. (2001). Alterations in chromatin structure are implicated in the activation of the steroid hormone response unit of the ovalbumin gene. *DNA & Cell Biology* 20 : 27-39.
- 25 Dierich, A., M. P. Gaub, et al. (1987). Cell-specificity of the chicken ovalbumin and conalbumin promoters. *Embo J* 6 : 2305-2312.

- Dolle, A. and W. H. Stratling (1990). Genomic footprinting of proteins interacting with the chicken lysozyme promoter Gene 95 : 187-193.
- Dominguez-Steglich, M., J. M. Jeltsch, et al. (1992). In situ mapping of the chicken progesterone receptor gene and the ovalbumin gene. Genomics 13 : 1343-1344.
- 5 Donoho, G., M. Jasin, et al. (1998). Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. Mol Cell Biol 18 : 4070-4078.
- Dronkert, M. L., H. B. Beverloo, et al. (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. Mol Cell Biol 20 : 3147-3156.
- 10 Elliott, B. and M. Jasin (2001). Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. Mol Cell Biol 21 : 2671-2682.
- Essers, J., R. W. Hendriks, et al. (1997). Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. Cell 89 : 195-204.
- 15 Evans, M. I. and G. S. McKnight (1984). Regulation of the ovalbumin gene: effects of insulin, adenosine 3',5'- monophosphate, and estrogen. Endocrinology 115 : 368-377.
- Faust, N., C. Bonifer, et al. (1999). Differential activity of the -2.7 kb chicken lysozyme enhancer in macrophages of different ontogenic origins is regulated by C/EBP and PU.1 transcription factors. DNA Cell Biol 18 : 631-642.
- 20 Fritton, H. P., A. E. Sippel, et al. (1983). Nuclease-hypersensitive sites in the chromatin domain of the chicken lysozyme gene. Nucleic Acids Res 11 : 3467-3485.
- Fritton, H. P., T. Igo-Kemenes, et al. (1987). DNase I-hypersensitive sites in the chromatin structure of the lysozyme gene in steroid hormone target and non-target cells. Biol Chem Hoppe Seyler 368 : 111-119.
- 25 Fujitani, Y., K. Yamamoto, et al. (1995). Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length. Genetics 140 : 797-809.

- Gannon, F., K. O'Hare, et al. (1979). Organisation and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene. *Nature* 278 : 428-434.
- Goethe, R. and P. V. Loc (1994). The far upstream chicken lysozyme enhancer at -6.1 kilobase, by interacting with NF-M, mediates lipopolysaccharide-induced expression of the chicken lysozyme gene in chicken myelomonocytic cells. *J Biol Chem* 269 : 31302-31309.
- Goethe, R. and L. Phi-van (1998). Posttranscriptional lipopolysaccharide regulation of the lysozyme gene at processing of the primary transcript in myelomonocytic HD11 cells. *J Immunol* 160 : 4970-4978.
- 10 Gossen, M. and H. Bujard (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 : 5547-5551.
- Grajer, K. H., A. Horlein, et al. (1993). Hepatic nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) is expressed in the oviduct of hens and interacts with regulatory elements of the lysozyme gene. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374 : 319-326.
- 15 Grewal, T., M. Theisen, et al. (1992). The -6.1-kilobase chicken lysozyme enhancer is a multifactorial complex containing several cell-type-specific elements. *Mol Cell Bio* 12: 2339-2350.
- Haecker, S. A., T. Muramatsu, et al. (1995). Repression of the ovalbumin gene involves multiple negative elements including a ubiquitous transcriptional silencer. *Mol*
- 20 *Endocrinol* 9 : 1113-1126.
- Hasty, P., M. Crist, et al. (1994). Efficiency of insertion versus replacement vector targeting varies at different chromosomal loci. *Mol Cell Biol* 14 : 8385-8890.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* 11 : 5586-5591.
- 25 Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1992). The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 12 : 2464-2474.

- Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1995). Gene conversion during vector insertion in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 23 : 2058-2064.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11 : 4509-
5 4517.
- Hecht, A., A. Berkenstam, et al. (1988). A progesterone responsive element maps to the far upstream steroid dependent DNase hypersensitive site of chicken lysozyme chromatin. *Embo J* 7 : 2063-2073.
- Himly M, DN Foster et al. (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation
10 induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* 248 : 295-304.
- Huber, M. C., T. Graf, et al. (1995). Dynamic changes in the chromatin of the chicken lysozyme gene domain during differentiation of multipotent progenitors to macrophages. *DNA Cell Biol* 14 : 397-402.
- 15 Hwung, Y. P., D. T. Crowe, et al. (1988a). The COUP transcription factor binds to an upstream promoter element of the rat insulin II gene. *Mol Cell Biol* 8 : 2070-2077.
- Hwung, Y. P., L. H. Wang, et al. (1988b). Differential binding of the chicken ovalbumin upstream promoter (COUP) transcription factor to two different promoters. *J Biol Chem* 263 : 13470-13474.
- 20 Indra A.K., Warot X. Et al., (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27 : 4324-4327.
- Ivanov, E. L. and J. E. Haber (1997). DNA repair: RAD alert. *Curr Biol* 7 : R492-495.
- 25 Jantzen, K., H. P. Fritton, et al. (1986). The DNase I sensitive domain of the chicken lysozyme gene spans 24 kb. *Nucleic Acids Res* 14 : 6085-6099.

- Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* 12 : 224-228.
- Jeltsch, J. M. and P. Chambon (1982). The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. *Eur J Biochem* 122 : 291-295.
- 5 Jeltsch, J. M., R. Hen, et al. (1987). Sequence of the chicken ovotransferrin gene. *Nucleic Acids Res* 15 : 7643-7645.
- Kato, S., L. Tora, et al. (1992). A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell* 68 : 731-742.
- 10 Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T. (1987). Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res.* 47 : 4460-4463.
- Kida, S., Y. Miura, et al. (1995). Effects of insulin-like growth factor-I, estrogen, glucocorticoid, and transferrin on the mRNA contents of ovalbumin and conalbumin in
15 primary cultures of quail (*Coturnix coturnix japonica*) oviduct cells. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 110 : 157- 164.
- Kim S et al. (1990). Ongoing diversification of the rearranged immunoglobulin light-chain gene in a bursal lymphoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3224-3231.
- Kim H., You S. et al. (2001). Increased mitochondrial-encoded gene transcription in
20 immortal DF-1 cells. *Exp Cell Res* 265 : 339-347.
- Kimura, A., A. Nishiyori, et al. (1993). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor- 4 (HNF-4). *J Biol Chem* 268 : 11125-11133.
- 25 Klinge, C. M., B. F. Silver, et al. (1997). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor interacts with estrogen receptor, binds to estrogen response elements

- and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression. *J Biol Chem* 272 : 31465-31474.
- Knoll, B. J., T. Zarucki-Schulz, et al. (1983). Definition of the ovalbumin gene promoter by transfer of an ovalglobin fusion gene into cultured cells. *Nucleic Acids Res* 11 : 6733-6754.
- Kohne, A. C., A. Baniahmad, et al. (1993). NeP1. A ubiquitous transcription factor synergizes with v-ERBA in transcriptional silencing. *J Mol Biol* 232 : 747-755.
- Kontaraki, J., H. H. Chen, et al. (2000). Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before trans-activator binding and gene expression. *Genes Dev* 14 : 2106-2122.
- Kumar, S. and J. P. Simons (1993). The effects of terminal heterologies on gene targeting by insertion vectors in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 21 : 1541-1548.
- Leblanc P., Dastugue B. et al. (1999). The integration machinery of ZAM, a retroelement from *Drosophila melanogaster*, acts as a sequence -specific endonuclease. *J Virol* 73 : 7061-7064.
- Leblanc, P., Desset S. et al. (1997). invertebrate retroviruses : ZAM a new candidate in *D.melanogaster*. *Embo J.*, 16 : 7521-7531.
- Ledermann, B. (2000). Embryonic stem cells and gene targeting. *Exp Physiol* 85 : 603-613.
- LeMeur, M., N. Glanville, et al. (1981). The ovalbumin gene family: hormonal control of X and Y gene transcription and mRNA accumulation. *Cell* 23 : 561-571.
- Li-Chan E. and S. Nakai. (1989). Critical reviews : Biochemical basis for the properties of egg white. *Poultry Biology* 2, 21-58.

- Loc, P. V. and W. H. Stratling (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *Embo J* 7 : 655-664.
- Lukacsovich, T. and A. S. Waldman (1999). Suppression of intrachromosomal gene
5 conversion in mammalian cells by small degrees of sequence divergence. *Genetics* 151 : 1559-1568.
- McReynolds, L., B. W. O'Malley, et al. (1978). Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature* 273 : 723-728.
- Metzger, D. and P. Chambon (2001). Site- and time-specific gene targeting in the
10 mouse. *Methods* 24 : 71-80.
- Metzger, D., J. Clifford, et al. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 : 6991-6995.
- Mink, S., B. Mutschler, et al. (1996). A novel function for Myc: inhibition of C/EBP-
15 dependent gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 6635-6640.
- Mohammed, S. M., S. Morrison, et al. (1998). Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* 4 : 115-125.
- Monroe, D. G. and M. M. Sanders (2000). The COUP-adjacent repressor (CAR) element participates in the tissue- specific expression of the ovalbumin gene. *Biochim*
20 *Biophys Acta* 1517 : 27-32.
- Morrison, C., A. Shinohara, et al. (1999). The essential functions of human Rad51 are independent of ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* 19 : 6891-6897.
- Morrison, C., E. Sonoda, et al. (2000). The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *Embo J* 19 : 463-471.
- 25 Morrison, C. and S. Takeda (2000). Genetic analysis of homologous DNA recombination in vertebrate somatic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 32 : 817-831.

- Moynahan, M. E., J. W. Chiu, et al. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 4 : 511-518.
- Muramatsu, T., H. Hiramatsu, et al. (1995). Induction of ovalbumin mRNA by ascorbic acid in primary cultures of tubular gland cells of the chicken oviduct. *Comp Biochem*
5 *Physiol B Biochem Mol Biol* 112 : 209-216.
- Nguyen-Huu, M. C., M. Stratmann, et al. (1979). Chicken lysozyme gene contains several intervening sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 : 76-80.
- Nau F. (1987). Synthèse bibliographique, Le jaune d'oeuf, ENSA, INRA, .
- Nowock, J. and A. E. Sippel (1982). Specific protein-DNA interaction at four sites
10 flanking the chicken lysozyme gene. *Cell* 30 : 607-615.
- Pain B, Chenevier P, Samarut J (1999). Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies. *Cell Tissues Organs* 165 : 212-219.
- Pain, B., M. E. Clark, et al. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*
15 *122* : 2339-2348.
- Palmiter, R. D., E. R. Mulvihill, et al. (1981). Steroid hormone regulation of ovalbumin and conalbumin gene transcription. A model based upon multiple regulatory sites and intermediary proteins. *J Biol Chem* 256 : 7910-7916.
- Phillips, J. E. and M. P. Calos (1999). Effects of homology length and donor vector
20 arrangement on the efficiency of double-strand break-mediated recombination in human cells. *Somat Cell Mol Genet* 25 : 91-100.
- Phi-Van, L., J. P. von Kries, et al. (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol Cell Biol* 10 :
25 2302-2307.

- Phi-van, L., C. Sellke, et al. (1998). An initiation zone of chromosomal DNA replication at the chicken lysozyme gene locus. *J Biol Chem* 273 : 18300-18307.
- Phi-Van, L. and W. H. Stratling (1996). Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene expression and to dampen position effects. *Biochemistry* 35 : 10735-10742.
- Phi van, L. (1996). Transcriptional activation of the chicken lysozyme gene by NF-kappa Bp65 (RelA) and c-Rel, but not by NF-kappa Bp50. *Biochem J* 313 : 39-44.
- Phi-van, L. and W. H. Stratling (1999). An origin of bidirectional DNA replication is located within a CpG island at the 3' end of the chicken lysozyme gene. *Nucleic Acids Res* 27 : 3009-3017.
- Porter, G., J. Westmoreland, et al. (1996). Homologous and homeologous intermolecular gene conversion are not differentially affected by mutations in the DNA damage or the mismatch repair genes RAD1, RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, PMS1 and MSH2. *Genetics* 143 : 755-767.
- Pereira, F. A., Y. Qiu, et al. (1995). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53 : 503-508.
- Ramirez-Solis, R., A. C. Davis, et al. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 225: 855-878.
- Regenhard, P., R. Goethe, et al. (2001). Involvement of PKA, PKC, and Ca²⁺ in LPS-activated expression of the chicken lysozyme gene. *J Leukoc Biol* 69 : 651-658.
- Renkawitz, R., G. Schutz, et al. (1984a). Sequences in the promoter region of the chicken lysozyme gene required for steroid regulation and receptor binding. *Cell* 37 : 503-510.

- Renkawitz, R., H. Beug, et al. (1982). Expression of a chicken lysozyme recombinant gene is regulated by progesterone and dexamethasone after microinjection into oviduct cells. *Cell* 31 : 167-176.
- Renkawitz, R., U. Danesch, et al. (1984b). Steroid controlled expression of the chicken
5 lysozyme and the rat tryptophan oxygenase gene after transfer into eukaryotic cells. *J Steroid Biochem* 20 : 99-104.
- Robine, S., F. Jaisser, et al. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. IV. Controlled spatiotemporal expression of transgenes: new tools to study normal and pathological states. *Am J Physiol* 273 : G759-762.
- 10 Robinson, C. E., X. Wu, et al. (1999). A corepressor and chicken ovalbumin upstream promoter transcriptional factor proteins modulate peroxisome proliferator-activated receptor- gamma2/retinoid X receptor alpha-activated transcription from the murine lipoprotein lipase promoter. *Endocrinology* 140 : 1586-1593.
- Sanders, M. M. and G. S. McKnight (1988). Positive and negative regulatory elements
15 control the steroid- responsive ovalbumin promoter. *Biochemistry* 27 : 6550-6557.
- Sargent, R. G., M. A. Brenneman, et al. (1997). Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol Cell Biol* 17 : 267-277.
- Sargent, R. G., J. L. Meservy, et al. (2000). Role of the nucleotide excision repair gene
20 ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 28 : 3771-3778.
- Sarig, R., V. Mezger-Lallemand, et al. (2000). Increased efficiency of homologous recombination in ES cells by cleavage at both ends of homology in the targeting vector. *Transgenic Res* 9 : 79-80.
- 25 Sauveur B. (1988). Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA eds

- Sawaya, B. E., O. Rohr, et al. (1996). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, a transcriptional activator of HIV-1 gene expression in human brain cells. *J Biol Chem* 271 : 23572-23576.
- 5 Sawicki, J. A., B. Monks, et al. (1998). Cell-specific ecdysone-inducible expression of FLP recombinase in mammalian cells. *Biotechniques* 25 : 868-870, 872-875.
- Schaeffer, E., M. A. Lucero, et al. (1987). Complete structure of the human transferrin gene. Comparison with analogous chicken gene and human pseudogene. *Gene* 56 : 109-116.
- 10 Schweers, L. A., D. E. Frank, et al. (1990). The steroid-dependent regulatory element in the ovalbumin gene does not function as a typical steroid response element. *J Biol Chem* 265 : 7590-7595.
- Schweers, L. A. and M. M. Sanders (1991). A protein with a binding specificity similar to NF-kappa B binds to a steroid-dependent regulatory element in the ovalbumin gene. *J Biol Chem* 266 : 10490-10497.
- 15 Sensenbaugh, K. R. and M. M. Sanders (1999). Multiple promoter elements including a novel repressor site modulate expression of the chick ovalbumin gene. *DNA Cell Biol* 18 : 147-156.
- Shcherbakova, O. G., V. A. Lanzov, et al. (2000). Overexpression of bacterial RecA protein stimulates homologous recombination in somatic mammalian cells. *Mutat Res* 20 459 : 65-71.
- Shibata, H., Z. Nawaz, et al. (1997). Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT). *Mol Endocrinol* 11 : 714-724.
- 25 Shinohara, M., E. Shita-Yamaguchi, et al. (1997). Characterization of the roles of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 gene and a homologue of RAD54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis. *Genetics* 147 : 1545-1556.

- Short, M. L., J. Nickel, et al. (1996). Lysozyme gene expression and regulation. *Exs* 75: 243-257.
- Short, M. L., J. Nickel, et al. (1996). In vivo protein interaction with the mouse M-lysozyme gene downstream enhancer correlates with demethylation and gene
5 expression. *Cell Growth Differ* 7 : 1545-1550.
- Sippel, A. E., H. Land, et al. (1978). Cloning of chicken lysozyme structural gene sequences synthesized in vitro. *Nucleic Acids Res* 5 : 3275-3294.
- Skafar, D. F. and S. S. Seaver (1985). Desensitization of the chick oviduct to estrogen: mediation at different levels of gene expression. *Endocrinology* 116 : 1755-1762.
- 10 Skoufos, E. and M. M. Sanders (1992). Regulation of expression of the chicken ovalbumin gene: interactions between steroid hormones and second messenger systems. *Mol Endocrinol* 6 : 1412-1417.
- Steiner, C., M. Muller, et al. (1987). Lysozyme gene activity in chicken macrophages is controlled by positive and negative regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 15 : 4163-
15 4178.
- Stevens L. (1991). Egg white proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 1-9.
- Stief, A., D. M. Winter, et al. (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position- independent gene activity. *Nature* 341 : 343-345.
- Takata, M., M. S. Sasaki, et al. (2000). The Rad51 paralog Rad51B promotes
20 homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 20 : 6476-6482.
- Takata, M., M. S. Sasaki, et al. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17 : 5497-5508.
- 25 Templeton, N. S. (2000). Strategies for improving the frequency and assessment of homologous recombination. *Methods Mol Biol* 133 : 45-60.

- Te Riele, H., E. R. Maandag, et al. (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 : 5128-5132.
- Thompson, S., A. R. Clarke, et al. (1989). Germ line transmission and expression of a
5 corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56 : 313-321.
- Theisen, M., A. Stief, et al. (1986). The lysozyme enhancer: cell-specific activation of the chicken lysozyme gene by a far-upstream DNA element. *Embo J* 5 : 719-724.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting
10 in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51 : 503-512.
- Vallier, L., J. Mancip, et al. (2001). An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 2467-2472.
- von der Ahe, D., J. M. Renoir, et al. (1986). Receptors for glucocorticosteroid and
15 progesterone recognize distinct features of a DNA regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 2817-2821.
- von Kries, J. P. and W. H. Stratling (1988). Lysozyme gene specific transcription in isolated hen oviduct nuclei. *Int J Biochem* 20 : 633-637.
- Wang, L. H., S. Y. Tsai, et al. (1987). Purification and characterization of chicken
20 ovalbumin upstream promoter transcription factor from HeLa cells. *J Biol Chem* 262 : 16080-16086.
- Woo, S. L., W. G. Beattie, et al. (1981). Complete nucleotide sequence of the chicken chromosomal ovalbumin gene and its biological significance. *Biochemistry* 20 : 6437-6446.

- Yagi T, Y. Ikawa, et al. (1990). Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 :9918-9922.
- Yamaguchi-Iwai, Y., E. Sonoda, et al. (1998). Homologous recombination, but not
5 DNA repair, is reduced in vertebrate cells deficient in RAD52. *Mol Cell Biol* 18 : 6430-6435.
- Yamaguchi-Iwai, Y., E. Sonoda, et al. (1999). Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *Embo J* 18 : 6619-6629.
- Yanagawa, Y., T. Kobayashi, et al. (1999). Enrichment and efficient screening of ES
10 cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res* 8 : 215-221.
- Yancey-Wrona, J. E. and R. D. Camerini-Otero (1995). The search for DNA homology does not limit stable homologous pairing promoted by RecA protein. *Curr Biol* 5 : 1149-1158.
- 15 Yanez, R. J. and A. C. Porter (2000). Uracil incorporation into a gene targeting construct reduces the frequency of homologous and nonhomologous recombinants in human cells. *Mutat Res* 461 : 157-62.
- Yanez, R. J. and A. C. Porter (1999). Influence of DNA delivery method on gene targeting frequencies in human cells. *Somat Cell Mol Genet* 25 : 27-31.
- 20 Zheng, H., P. Hasty, et al. (1991). Fidelity of targeted recombination in human fibroblasts and murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 : 8067-8071.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une cellule aviaire pour la production d'une protéine exogène d'intérêt dans un animal appartenant à l'espèce aviaire, caractérisée en ce que ladite cellule est transformée par un vecteur d'expression comprenant le gène codant pour ladite protéine, ladite cellule étant introduite soit dans la cavité sub-germinale d'un embryon, la circulation sanguine de l'embryon ou servant de source de noyau pour le transfert nucléaire dans un ovocyte énucléé ou non, ou dont les chromosomes ont été détruits.
2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le vecteur permet une expression tissu-spécifique, en particulier dans l'oviducte, le foie, le sang, la moelle et les organes lymphoïdes.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisée en ce que le vecteur est un vecteur de recombinaison homologue possédant des bras 5' et 3' d'homologie aux séquences d'un locus donné.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le locus ciblé est sélectionné parmi le locus de l'ovalbumine, des ovomucoïdes, de la conalbumine et du lysozyme.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que le vecteur de recombinaison homologue comprend dans une base plasmidique un enchaînement de au moins un élément pris successivement parmi
 - a) un fragment d'ADN génomique contenant le bras d'homologie 5' du gène ciblé fusionné à,
 - b) une séquence nucléotidique signal de sécrétion fusionnée à,
 - c) une courte séquence nucléotidique intronique fusionnée à,
 - d) la séquence nucléotidique codante pour la protéine d'intérêt fusionnée à,
 - e) une séquence poly A de terminaison de la transcription fusionnée à,

- f) une cassette de sélection positive comprenant un promoteur, un gène de résistance à un agent de sélection et une séquence poly A de terminaison de transcription, ladite cassette pouvant être fusionnée à,
- g) un fragment d'ADN génomique contenant le bras d'homologie 3' du gène ciblé,
- 5 h) une cassette de sélection négative comprenant un promoteur, un gène assurant la transformation d'un substrat présent dans le milieu de culture en une substance toxique pour la cellule qui exprime le gène et une séquence polyA de terminaison de transcription.
- 10 6. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le vecteur comprend d) la séquence codante pour la protéine exogène fusionnée en son extrémité 5' avec c) une courte séquence intronique en particulier comprenant la séquence SEQ ID N° 1 elle même fusionnée avec e) une séquence peptide signal de sécrétion, en particulier la séquence codante pour le peptide signal du lysozyme
- 15 comprenant la séquence SEQ ID N° 2.
7. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le vecteur comprend d) la séquence codante pour la protéine exogène fusionnée en son extrémité 3' avec une séquence poly A.
- 20 8. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le vecteur comprend au moins une séquence IRES en fusion avec au moins deux séquences codantes pour la protéine d'intérêt exogène.
- 25 9. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le vecteur comprend au moins une séquence IRES en fusion avec au moins deux séquences codantes pour différentes chaînes constituant une protéine d'intérêt, en particulier les chaîne lourde et légère d'un anticorps de quelque nature que ce soit, en particulier un anticorps monoclonal, un fragment fab.

10. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la séquence IRES est prise dans le groupe des séquences IRES de groupe I ou de groupe II, en particulier les séquences VI30, Idemfix, Zam,
- 5 11. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisée en ce que le vecteur est un vecteur d'expression comprenant la séquence codante pour la protéine d'intérêt fusionnée avec au moins un élément pris parmi
- a) un promoteur, en particulier sélectionné parmi les promoteurs des gènes de l'ovalbumine, des ovomucoïdes, de la conalbumine et du lysozyme,
- 10 b) une séquence peptide signal
- c) une séquence nucléotidique polyA de terminaison de transcription.
12. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le vecteur d'expression comprend une séquence IRES fusionnée avec au moins deux
- 15 séquences codantes pour la même protéine d'intérêt ou pour des séquences codantes différentes
13. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la cellule est une cellule aviaire embryonnaire primaire.
- 20 14. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la cellule est une cellule aviaire embryonnaire souche, en particulier les cellules embryonnaires souches issues de la mise en culture de blastodermes.
- 25 15. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la cellule embryonnaire aviaire présente un phénotype alcaline phosphatase positive, en particulier un phénotype de cellule souche embryonnaire alcaline phosphatase positive.
16. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la
- 30 cellule embryonnaire aviaire réagit spécifiquement avec au moins un anticorps

sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6, en particulier une cellule souche embryonnaire, une cellule germinale embryonnaire.

17. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la
5 cellule est une cellule aviaire primaire de phénotype défini en particulier pour un fibroblaste primaire, une cellule épithéliale, une cellule endothéliale.

18. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la
10 cellule est une cellule aviaire dérivée d'une cellule embryonnaire primaire et établie spontanément en culture ou à l'aide de différents agents immortalisants, en particulier les cellules dérivées des cellules souches embryonnaires induites à différencier sous l'action de différents agents inducteurs en particulier l'acide rétinoïque, le diméthylsulfoxyde, le TPA ou de conditions de cultures spécifiques, en particulier par la formation de corps embryoides

15 19. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisée en ce que la cellule est une cellule aviaire établie en lignée, en particulier les cellules hépatiques LMH, les cellules monocytes HD11, les cellules fibroblastiques QT6.

20 20. Utilisation selon l'une des revendications 13 à 19 caractérisée en ce que ladite cellule est transformée avec un vecteur d'expression exprimant une protéine de la famille Rad, en particulier la protéine Rad54.

21. Procédé d'obtention d'une cellule aviaire modifiée par un des vecteurs défini selon
25 l'une des revendications 5 à 11.

22. Procédé d'obtention d'une cellule aviaire modifiée selon la revendication 21 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes

a) introduction du vecteur défini selon l'une des revendications 5 à 11 dans une
30 cellule embryonnaire aviaire par une méthode de transfection, en particulier à l'aide d'un liposome, d'un polycation ou par électroporation

- b) sélection des cellules par l'addition d'un agent de sélection dans le milieu de culture, en particulier la généticine dans une gamme de concentration de 100 à 500 ug/ml
- c) criblage des clones résistants et amplification.

5

23. Procédé selon l'une des revendications 21 et 22 caractérisé en ce que le vecteur de recombinaison cible le locus du lysozyme.

24. Procédé selon la revendication 21 à 23 caractérisé en ce que le surnageant de culture des clones recombinés contient la protéine exogène d'intérêt, en particulier après induction du clone à l'aide de différents inducteurs, en particulier l'acide rétinoïque, le diméthylsulfoxyde, le TPA ou de conditions de cultures spécifiques, en particulier par la formation de corps embryoides.

25. Procédé selon la revendication selon l'une des revendications 21 à 24 caractérisé en ce que les deux allèles du locus ciblé sont modifiés.

26. Procédé selon l'une des revendications 21 à 25 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules aviaires embryonnaires primaires.

20

27. Procédé selon l'une des revendications 21 à 25 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules aviaires embryonnaires souches, en particulier les cellules embryonnaires souches issues de la mise en culture de blastodermes.

28. Procédé selon l'une des revendications 21 à 27 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules présentant un phénotype alcaline phosphatase positive, en particulier un phénotype de cellule souche embryonnaire alcaline phosphatase positive.

29. Procédé selon l'une des revendications 21 à 25 caractérisé en ce que les cellules embryonnaires aviaires réagissent spécifiquement avec au moins un anticorps sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6.

30

30. Procédé selon l'une des revendications 21 à 25 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules aviaires primaires de phénotype défini en particulier pour un fibroblaste primaire, une cellule épithéliale, ou une cellule endothéliale.

5

31. Procédé selon l'une des revendications 21 à 25 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules aviaires dérivées d'une cellule embryonnaire primaire et établie en lignée à l'aide de différents agents immortalisants, en particulier les cellules dérivées des cellules souches embryonnaires induites à différencier sous l'action de différents agents inducteurs en particulier l'acide rétinoïque, le diméthylsulfoxyde, le TPA ou de conditions de cultures spécifiques, en particulier par la formation de corps embryoides.

10

32. Procédé selon l'une des revendications 21 à 25 caractérisé en ce que les cellules sont des cellules aviaires établies en lignée, en particulier les cellules hépatiques LMH, les cellules monocytes HD11, les cellules fibroblastiques QT6.

15

33. Procédé selon l'une des revendications 21 à 32 caractérisé en ce que lesdites cellules sont transformées avec un vecteur d'expression exprimant une protéine de la famille Rad, en particulier la protéine Rad54.

20

34. Procédé selon l'une des revendications 21 à 33 caractérisé en ce que le milieu utilisé comprend des anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA).

35. Procédé selon l'une des revendications 21 à 34 caractérisé en ce que le milieu utilisé comprend une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6 et leurs différents mélanges.

25

36. Procédé selon l'une des revendications 21 à 35 caractérisé en ce que le milieu utilisé comprend différents facteurs en particulier le SCF, l'IGF-1, le bFGF, le CNTF et l'Oncostatine.

30

37. Procédé d'obtention d'un animal appartenant à l'espèce aviaire capable d'exprimer une protéine exogène d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) obtention de cellules aviaires modifiées par le procédé défini selon l'une des revendications 21 à 36,
 - 5 b) introduction de la cellule obtenue à l'étape a) dans la cavité sub-germinale d'un embryon, dans la circulation sanguine ou par transfert nucléaire du noyau de ladite cellule dans un ovocyte énucléé ou non énucléé, et
 - c) incubation de l'embryon obtenu à l'étape c).
- 10 38. Procédé selon la revendication 37 caractérisé en ce que le vecteur utilisé à l'étape a) permet une expression tissu-spécifique, en particulier dans l'oviducte, le foie, le sang, la moelle et les organes lymphoïdes.
39. Procédé selon l'une des revendications 37 et 38 pour obtenir un animal appartenant
- 15 à l'espèce aviaire présentant une expression tissu-spécifique d'une protéine exogène d'intérêt, caractérisé en ce que le vecteur est un vecteur de recombinaison homologue possédant parmi différents éléments constitutifs nécessaires à son fonctionnement des bras 5' et 3' d'homologie aux séquences d'un locus donné, notamment un locus sélectionné parmi le locus de l'ovalbumine, des ovomucoïdes, de la conalbumine et du
- 20 lysozyme.
40. Procédé selon l'une des revendications 37 à 39, caractérisé en ce que le vecteur comprend la séquence codante pour la protéine exogène fusionnée avec au moins un élément sélectionné parmi une séquence intronique, une séquence peptide signal de
- 25 sécrétion, en particulier le peptide signal du lysozyme comprenant la séquence SEQ ID No 2, une séquence poly A, un IRES et un promoteur, en particulier choisi parmi les promoteurs des gènes de l'ovalbumine, des ovomucoïdes, de la conalbumine et du lysozyme.

41. Procédé selon l'une des revendications 37 à 40, caractérisé en ce que l'étape b) comprend en outre la transformation des cellules aviaires avec un vecteur exprimant une protéine de la famille Rad, en particulier Rad54.
- 5 42. Procédé de production d'une protéine d'intérêt comprenant l'extraction de la protéine exogène exprimée dans les tissus d'un animal obtenu à partir du procédé selon l'une des revendications 37 à 41.
43. Procédé de production d'une protéine d'intérêt comprenant l'extraction de la
10 protéine exogène exprimée dans le surnageant des cellules issues du procédé selon l'une des revendications 21 à 36.
44. Procédé selon la revendication 42 caractérisé en ce que la protéine est extraite du sang, du jaune ou du blanc d'œuf.
- 15 45. Animal appartenant à l'espèce aviaire susceptible d'être obtenu à partir du procédé selon l'une des revendications 37 à 41, caractérisé en ce qu'il exprime une protéine exogène dans un tissu spécifique.
- 20 46. Animal selon la revendication 45, caractérisé en ce qu'il exprime une protéine exogène dans le foie, le sang, la moelle, les organes lymphoïdes ou l'oviducte.
47. Œuf susceptible d'être obtenu à partir d'un animal selon l'une des revendications 45 et 46, caractérisé en ce qu'une partie de ces composants, en particulier l'ovalbumine, les
25 ovomucoïdes, la conalbumine et le lysozyme soit partiellement ou totalement remplacée par une protéine d'intérêt exogène, sélectionnée notamment parmi les peptides à intérêt thérapeutique, les interleukines, les cytokines, les hormones, et les anticorps.
48. Œuf susceptible d'être obtenu à partir d'un animal selon la revendication 47,
30 caractérisé en ce qu'il comprend une proportion de protéine exogène comprise entre quelques mg (1 à 10 mg) et 500 mg de matières sèches en lieu et place d'une partie ou

de la totalité d'au moins une protéine endogène, choisie notamment parmi l'ovalbumine, les ovomucoïdes, la conalbumine, le lysozyme et l'avidine.

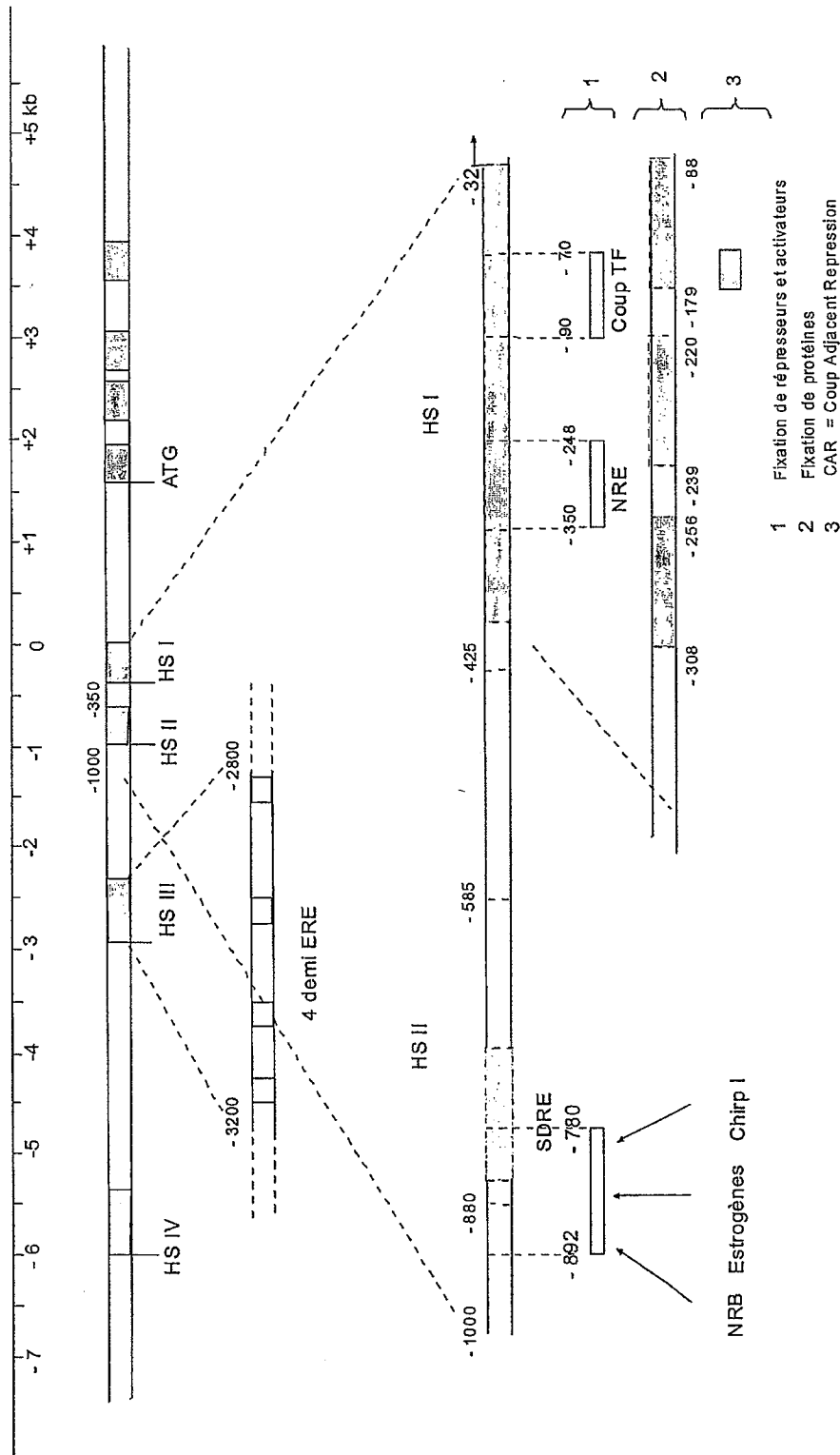


FIGURE 1

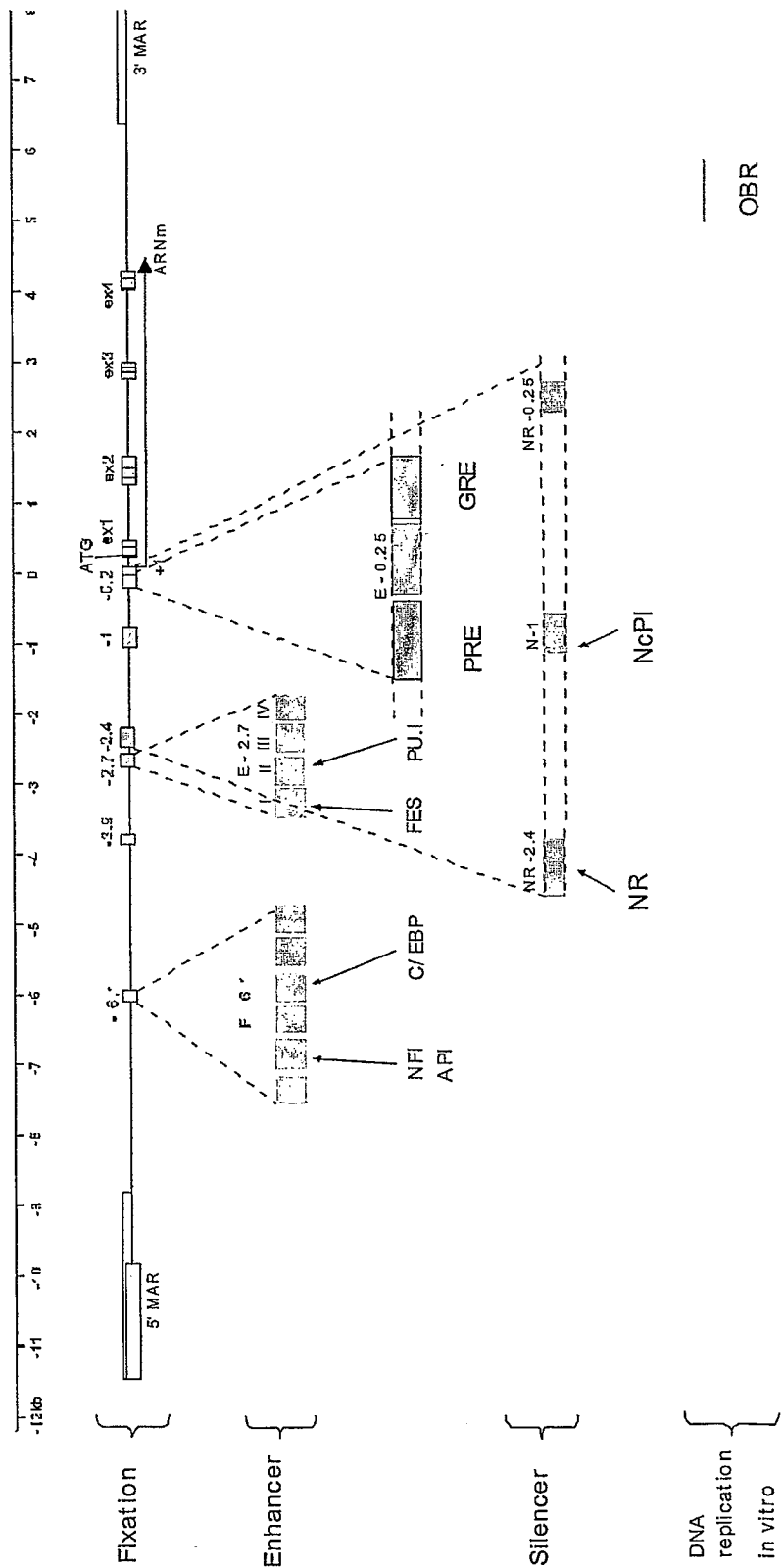


FIGURE 2

3 / 10

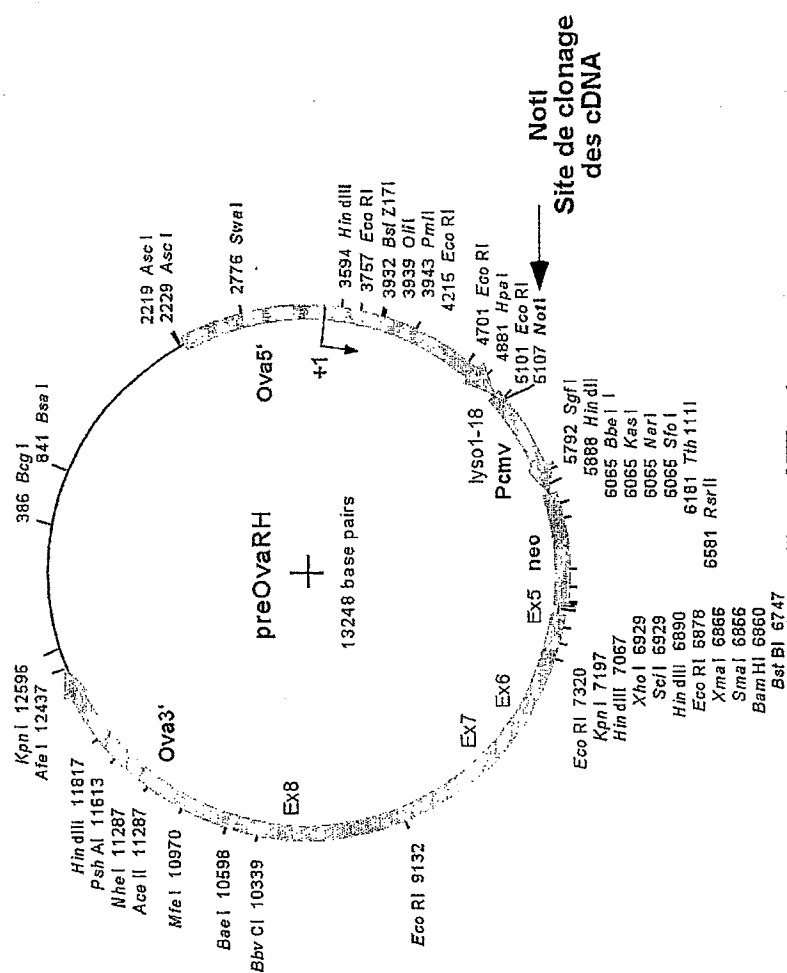


FIGURE 3

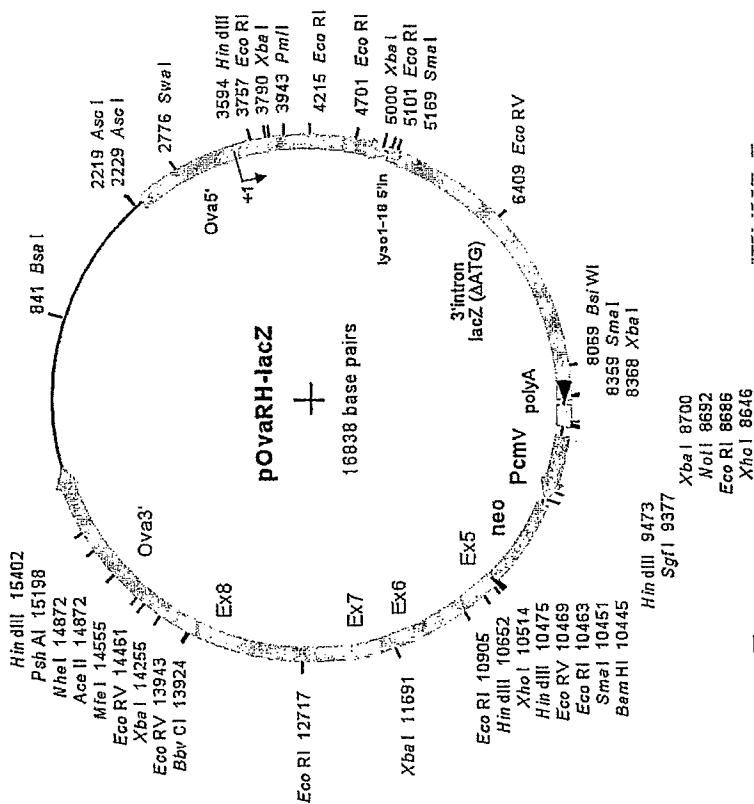


FIGURE 4

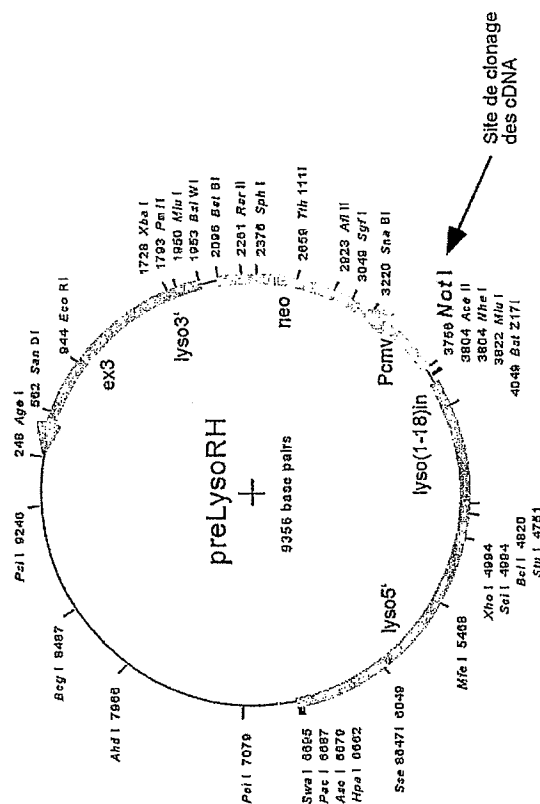


FIGURE 5

6 / 10

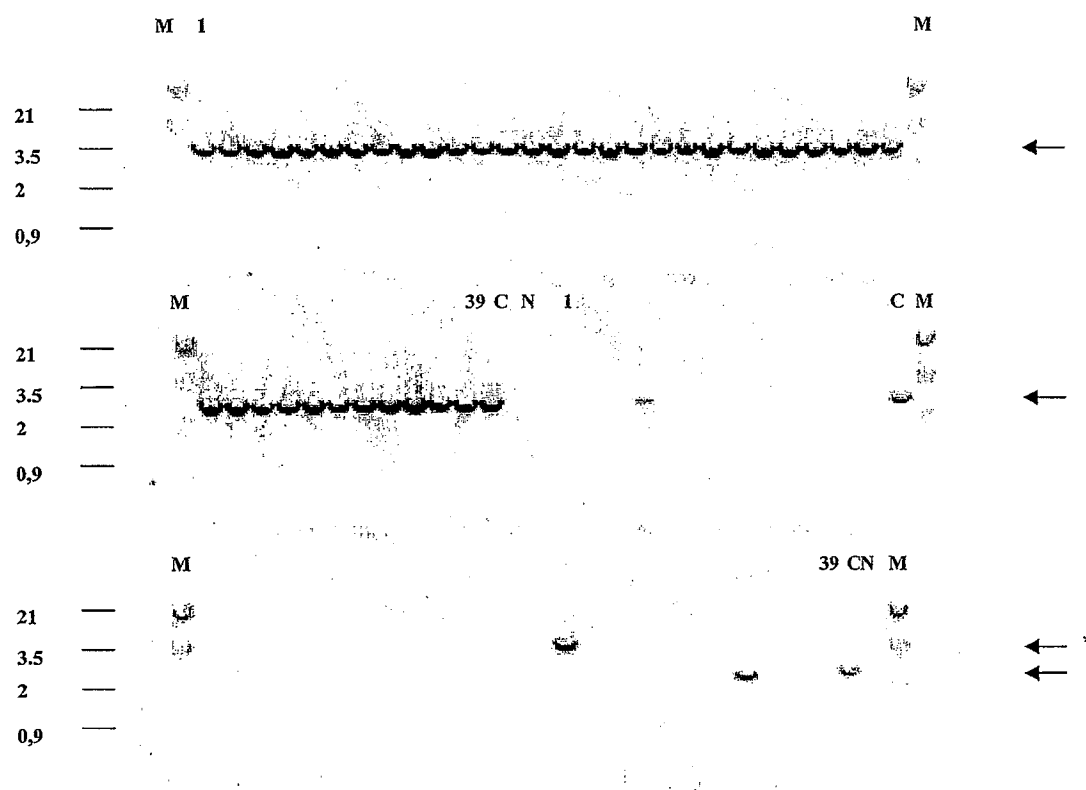


FIGURE 6

7 / 10

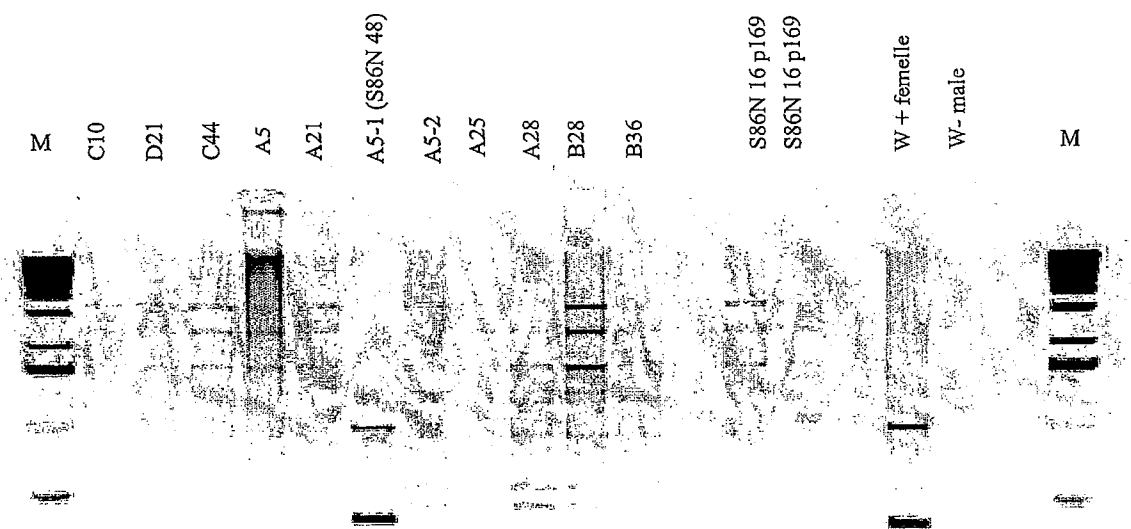


FIGURE 7

8 / 10

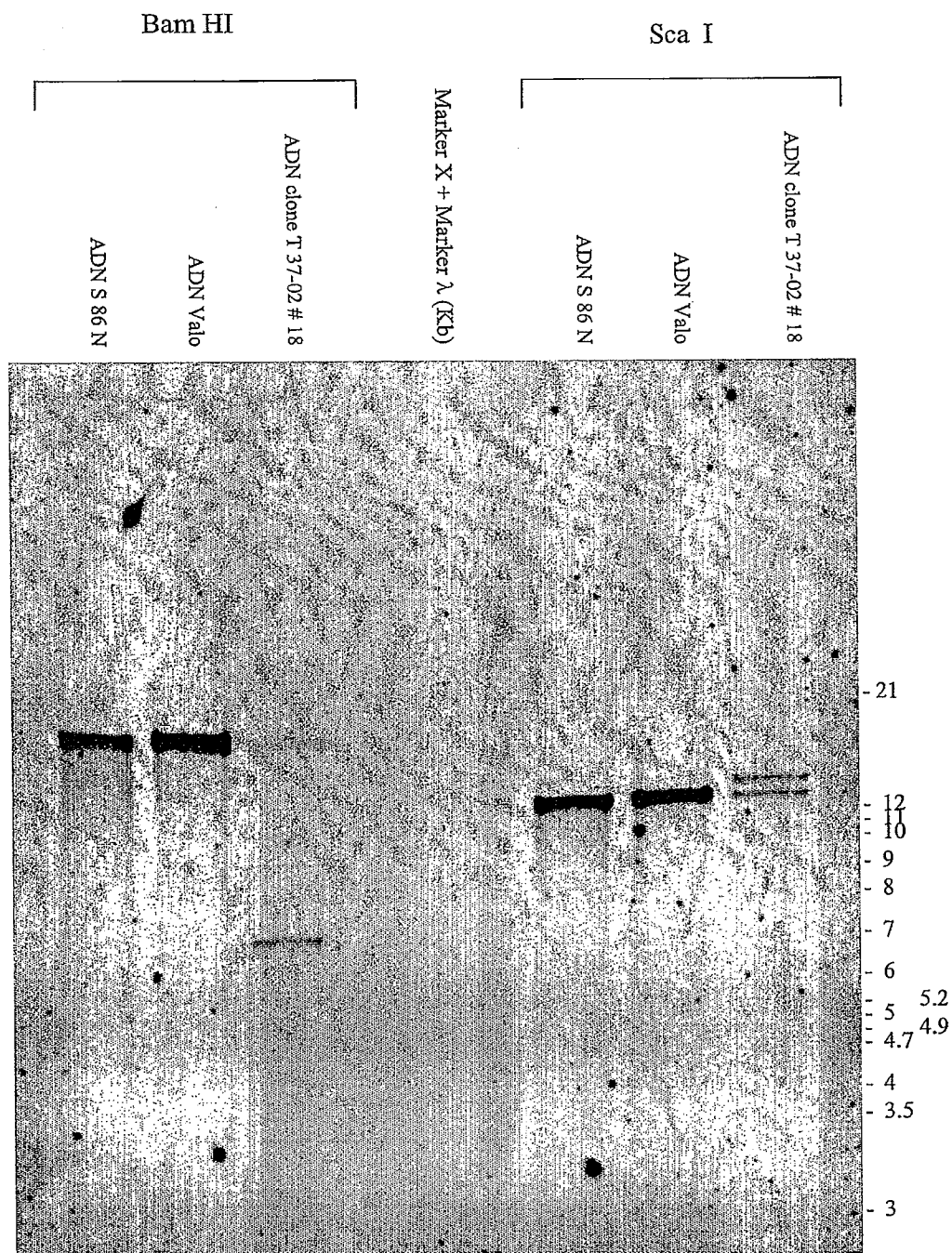


FIGURE 8A

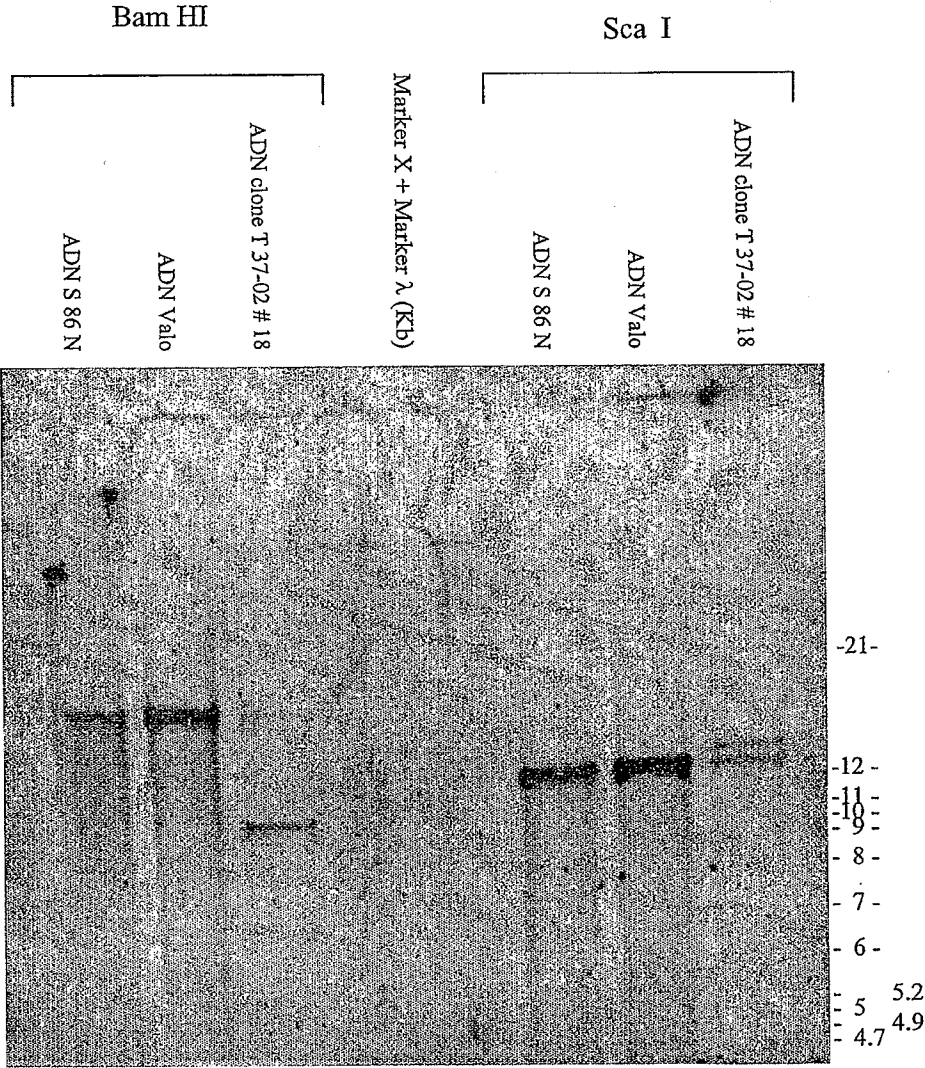
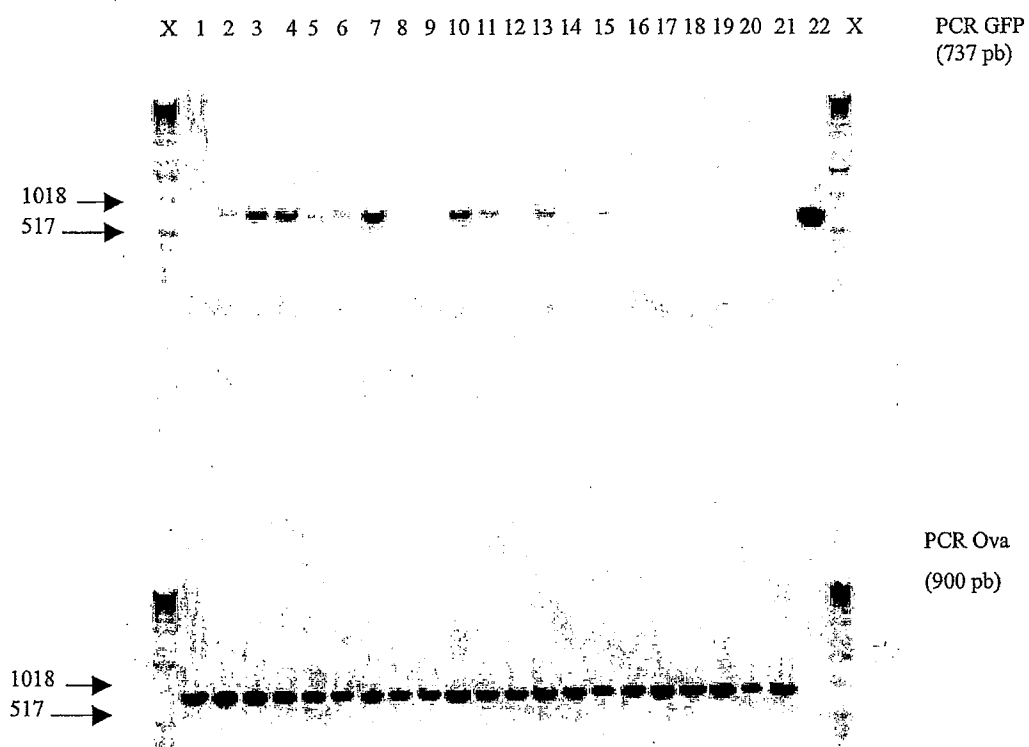


FIGURE 8B

10 / 10



X : marker de taille
1 : Témoin négatif: DNA de sang de poulet
22 : Témoin positif: plasmide pVVS65lin
2-16 : Embryons injectés
17-21 : Embryons non injectés

FIGURE 9

LISTE DE SEQUENCES

<110> VIVALIS
 INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS
 ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON - ENS

<120> Système d'expression de protéines exogènes dans un système aviaire

<130> D 19 900

<150> FR 01/15 111
 <151> 2001-11-22

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 161
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 Séquence de l'intron artificiel des vecteurs pOvaRH et pLysoRH

<400> 1
 gtaagtatca aggttacaag aattcgcggc cgctctagaa ctagtggatc ccccgggctg 60
 caggaattcg atatcaagct tataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatcccat 120
 cattggtctt actgacatcc actttgcctt tctctccaca g 161

<210> 2
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 Peptide signal de sécrétion du lysozyme

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (54)

<400> 2
 atg agg tct ttg cta atc ttg gtg ctt tgc ttc ctg ccc ctt gct gct 48
 Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 ctt ggt 54
 Leu Gly

<210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle:

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide IL-11 (-ATG) S

<400> 7

ctgaagcttg ttaactgtgt ttgccgcctg

30

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide IL-11 3'ncRevAS

<400> 8

cgctctagat gtatgacaca ttttaattccc

30

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide Lyso 1-18 S

<400> 9

ggggaattcc atgggtatga ggtctttgct aat

33

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide Lyso 1789 S

<400> 10

actatgacta ctggcaggag aatgaggaac

30

<210> 11

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide Lyso 2859 S

<400> 11

acttgacac ggaatatgga agggcatt

28

<210> 12

<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide Lyso 3185 AS

<400> 12
gtttgcgtat agtcgtttta atgagggatg cgt 33

<210> 13
<211> 40
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide OvaL 1657 S

<400> 13
cgcgctctcga gccagagagc tcatcaattc ctgggtagaa 40

<210> 14
<211> 40
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide OvaL 7707 AS

<400> 14
cgcgctctcga gttctatatg ggggtgtggtg acagagcaat 40

<210> 15
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide OvaL 80 AS

<400> 15
aattcgatgc ccatgatggc aatggggcag tagaagatg 39

<210> 16
<211> 40
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide Oval-2995 S

<400> 16

aattcggatc caacatttac tgggaagcac atctatcatc

40

<210> 17

<211> 57

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide SmaI3' in cDNA S

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(57)

<223> n signifie a, t, c ou g

<400> 17

ataccggga ttggtcttac tgacatccac ttgcttttc tctccacagn nnnnnnn

57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/03992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A01K67/027 C12N15/90 C12N15/63 C12N15/06 C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, SCISEARCH, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 19472 A (AVIGENICS ;UNIV GEORGIA (US)) 22 April 1999 (1999-04-22) page 5, line 1 -page 7, line 4 page 9, line 23 -page 11, line 13 ---	1-48
X	TOBA M ET AL: "Introduction of DT40 cells into chick embryos." ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY. CHINA MAR 2001, vol. 3, no. 1, March 2001 (2001-03), pages 49-53, XP002208512 the whole document ---	1-48
X	WO 98 38283 A (UNIV GUELPH ;ETCHES ROBERT J (CA)) 3 September 1998 (1998-09-03) page 11, line 9 - line 14 ---	1-48
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2003

Date of mailing of the international search report

25/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niemann, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/03992

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 47739 A (MACARTHUR WILLIAM C ;UNIV MICHIGAN (US); GENEWORKS L L C (US)) 18 December 1997 (1997-12-18) the whole document -----	
A	PAIN B ET AL: "CHICKEN EMBRYONIC STEM CELLS AND TRANSGENIC STRATEGIES" CELLS TISSUES ORGANS, KARGER, BASEL, CH, vol. 165, 1999, pages 212-219, XP000882175 ISSN: 1422-6405 cited in the application -----	
A	ZAJCHOWSKI LAURA D ET AL: "Transgenic chickens: Past, present, and future." AVIAN AND POULTRY BIOLOGY REVIEWS, vol. 11, no. 2, 2000, pages 63-80, XP001100013 ISSN: 1470-2061 the whole document -----	
A	PRELLE K ET AL: "ESTABLISHMENT OF PLURIPOTENT CELL LINES FROM VERTEBRATE SPECIES - PRESENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS" CELLS TISSUES ORGANS, KARGER, BASEL, CH, vol. 165, no. 3/4, 1999, pages 220-236, XP000914313 ISSN: 1422-6405 the whole document -----	
A	WO 01 84920 A (ADVANCED CELL TECHNOLOGY INC) 15 November 2001 (2001-11-15) the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/03992

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9919472	A	22-04-1999	AU 752946 B2	03-10-2002
			AU 1189999 A	03-05-1999
			CA 2307840 A1	22-04-1999
			EP 1023442 A1	02-08-2000
			JP 2001520009 T	30-10-2001
			WO 9919472 A1	22-04-1999
WO 9838283	A	03-09-1998	AU 6084898 A	18-09-1998
			WO 9838283 A1	03-09-1998
			EP 0973870 A1	26-01-2000
			JP 2001516206 T	25-09-2001
WO 9747739	A	18-12-1997	AU 726386 B2	02-11-2000
			AU 3479997 A	07-01-1998
			CA 2257871 A1	18-12-1997
			EP 0960194 A1	01-12-1999
			JP 2000512149 T	19-09-2000
			NZ 333295 A	26-05-2000
			NZ 503901 A	31-08-2001
			WO 9747739 A1	18-12-1997
WO 0184920	A	15-11-2001	AU 5970301 A	20-11-2001
			WO 0184920 A1	15-11-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der : Internationale No
PCT/FR 02/03992

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A01K67/027 C12N15/90 C12N15/63 C12N15/06 C12P21/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A01K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) WPI Data, EPO-Internal, SCISEARCH, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 19472 A (AVIGENICS ;UNIV GEORGIA (US)) 22 avril 1999 (1999-04-22) page 5, ligne 1 -page 7, ligne 4 page 9, ligne 23 -page 11, ligne 13 ---	1-48
X	TOBA M ET AL: "Introduction of DT40 cells into chick embryos." ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY. CHINA MAR 2001, vol. 3, no. 1, mars 2001 (2001-03), pages 49-53, XP002208512 le document en entier ---	1-48
X	WO 98 38283 A (UNIV GUELPH ;ETCHES ROBERT J (CA)) 3 septembre 1998 (1998-09-03) page 11, ligne 9 - ligne 14 --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-48
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">14 mars 2003</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">25/03/2003</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Niemann, F</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No

PCT/FR 02/03992

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 47739 A (MACARTHUR WILLIAM C ; UNIV MICHIGAN (US); GENEWORKS L L C (US)) 18 décembre 1997 (1997-12-18) le document en entier ---	
A	PAIN B ET AL: "CHICKEN EMBRYONIC STEM CELLS AND TRANSGENIC STRATEGIES" CELLS TISSUES ORGANS, KARGER, BASEL, CH, vol. 165, 1999, pages 212-219, XP000882175 ISSN: 1422-6405 cité dans la demande ---	
A	ZAJCHOWSKI LAURA D ET AL: "Transgenic chickens: Past, present, and future." AVIAN AND POULTRY BIOLOGY REVIEWS, vol. 11, no. 2, 2000, pages 63-80, XP001100013 ISSN: 1470-2061 le document en entier ---	
A	PRELLE K ET AL: "ESTABLISHMENT OF PLURIPOTENT CELL LINES FROM VERTEBRATE SPECIES - PRESENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS" CELLS TISSUES ORGANS, KARGER, BASEL, CH, vol. 165, no. 3/4, 1999, pages 220-236, XP000914313 ISSN: 1422-6405 le document en entier ---	
A	WO 01 84920 A (ADVANCED CELL TECHNOLOGY INC) 15 novembre 2001 (2001-11-15) le document en entier -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den Internationale No

PCT/FR 02/03992

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9919472	A	22-04-1999	AU 752946 B2	03-10-2002
			AU 1189999 A	03-05-1999
			CA 2307840 A1	22-04-1999
			EP 1023442 A1	02-08-2000
			JP 2001520009 T	30-10-2001
			WO 9919472 A1	22-04-1999
WO 9838283	A	03-09-1998	AU 6084898 A	18-09-1998
			WO 9838283 A1	03-09-1998
			EP 0973870 A1	26-01-2000
			JP 2001516206 T	25-09-2001
WO 9747739	A	18-12-1997	AU 726386 B2	02-11-2000
			AU 3479997 A	07-01-1998
			CA 2257871 A1	18-12-1997
			EP 0960194 A1	01-12-1999
			JP 2000512149 T	19-09-2000
			NZ 333295 A	26-05-2000
			NZ 503901 A	31-08-2001
			WO 9747739 A1	18-12-1997
WO 0184920	A	15-11-2001	AU 5970301 A	20-11-2001
			WO 0184920 A1	15-11-2001